

DE ROBERTIS (h.) · HIB · PONZIO

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

de Eduardo D. P. De Robertis



EL ATENEO



Las múltiples ediciones y traducciones a diferentes idiomas son una clara demostración de que *Biología Celular y Molecular* constituye un libro único e insustituible, una verdadera *suma* del conocimiento de la organización estructural y funcional de la célula.

Esta edición ha sido revisada y reescrita a los fines de ofrecer el estado actual del conocimiento. La totalidad del texto ha sido puesta al día y gran parte de las ilustraciones son nuevas o fueron recreadas.

Los capítulos que experimentaron cambios más profundos son los relativos a la membrana celular, la señalización intercelular, las mitocondrias y los peroxisomas, la estructura de los genes y su transcripción, la traducción del ARN mensajero, la replicación del ADN y la diferenciación celular. Entre sus novedades más salientes están las secciones dedicadas a la permeabilidad de la membrana, la regulación de la actividad génica, la reparación del ADN, el control del ciclo celular, los aspectos moleculares de la fecundación y la muerte celular.

El extraordinario desarrollo que ha adquirido el conocimiento de las funciones moleculares y las insospechadas aplicaciones de la bioingeniería hacen que su contenido sea insustituible para los cursos generales de biología y para las ciencias aplicadas, como la medicina, la veterinaria, la agronomía y la biotecnología.



**BIOLOGIA CELULAR
Y MOLECULAR
de Eduardo D. P. De Robertis**

BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

de Eduardo D. P. De Robertis

EDUARDO M. F. DE ROBERTIS

*Profesor Norman Sprague de Oncología Molecular
Universidad de California, Los Angeles, California*

JOSE HIB

*Profesor Regular Adjunto, Departamento de Biología Celular,
Histología, Embriología y Genética
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

ROBERTO PONZIO

*Profesor Regular Adjunto, Departamento de Biología Celular,
Histología, Embriología y Genética
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

Duodécima edición
tercera reimpresión



**LIBRERIA-EDITORIAL
EL ATENEO**

576
DER

De Robertis, Eduardo M. F.
Biología Celular y Molecular de Eduardo D. P. De Robertis /
Eduardo M. F. De Robertis, José Hib y Roberto Ponzio. -
12ª ed., 3a. reimp. - Buenos Aires: El Ateneo, 1998.
484 p.; 26 x 18 cm

ISBN 950-02-0364-2

I. Hib, José - II. Ponzio, Roberto - III. Título - 1. Biología
Celular

Primera edición, 1946
Segunda edición, 1948
Tercera edición, 1955
Cuarta edición, 1960
Quinta edición, 1963
Sexta edición, 1965
Séptima edición, 1968
Octava edición, 1970
Novena edición, 1977
Reimpresión, 1978

Décima edición, 1981
Cuarta reimpresión, 1985
Undécima edición, 1986
Primera reimpresión, 1987
Segunda reimpresión, 1988
Tercera reimpresión, 1990
Cuarta reimpresión, 1991
Quinta reimpresión, 1994
Sexta reimpresión, 1995
Duodécima edición, 1996
Segunda reimpresión, 1997
Tercera reimpresión, 1998

Editada en España en 1981
Segunda reimpresión, 1982
Tercera reimpresión, 1982
Cuarta reimpresión, 1984
Quinta reimpresión, 1984
Editada en inglés en 1948, 1954, 1960,
1965, 1970, 1975, 1980 y 1987
Editada en japonés en 1956 y 1968
Editada en ruso en 1962
Editada en italiano en 1966
Editada en polaco en 1969
Editada en húngaro en 1969
Editada en portugués en 1971, 1974 y 1980
Editada en chino en 1984

Diseño de tapa: Realizado por "EL BLOQUE" sobre una idea de Alejandro F. Demartini

Advertencia importante:

El derecho de propiedad de esta obra comprende para su autor la facultad de disponer de ella, publicarla, traducirla, adaptarla o autorizar su traducción y reproducirla en cualquier forma, total o parcialmente, por medios electrónicos o mecánicos, incluidas fotocopias, grabación magnetofónica y cualquier sistema de almacenamiento de información.

Por consiguiente, nadie tiene facultad de ejercitar los derechos precitados sin permiso del autor y del editor, por escrito.

Los infractores serán reprimidos con las penas del artículo 172 y concordantes del Código Penal (arts. 2, 9, 10, 71, 72, ley 11.723).

Queda hecho el depósito que establece la ley N° 11.723.
© 1998, "EL ATENEO" Pedro García S. A.
Librería, Editorial e Inmobiliaria.
Fundada en 1912 por don Pedro García.

Librería: Casa matriz: Florida 340 - (1005) Buenos Aires, República Argentina.
Tel.: 325-6801/06 - Libro/Fax: 325-6807

Editorial: Patagones 2463 - (1282) Buenos Aires, República Argentina.
Tel.: 942-9002/9052/9102/9152 - Fax: 942-9162

Internet: <http://www.ateneo.com>

ISBN 950-02-0364-2 (12ª edición)
ISBN 950-02-0215-8 (11ª edición)
ISBN 950-02-0027-9 (10ª edición)

Impreso en T. G. COLOR EFE,
Paso 192, Avellaneda, Buenos Aires,
el 13 de febrero de 1998.
Tirada: 3.000 ejemplares

IMPRESO EN LA ARGENTINA



Eduardo D. P. De Robertis
(1913-1988)

Maestro de la Medicina Argentina

Prefacio

Esta edición está dedicada al Profesor Eduardo Diego Patricio De Robertis (1913-1988), quien produjo, por primera vez en el mundo entero, un libro de texto que unificó elementos de la bioquímica, la genética y la fisiología de la célula. La primera edición apareció en 1946 y fue escrita juntamente con el bioquímico Wiktor Nowinski y el citogenetista Francisco A. Sáez. Puede afirmarse que ha sido precursora de la forma moderna de la enseñanza de la biología celular y molecular. A través de sus múltiples ediciones, este texto contribuyó a la formación de numerosas generaciones de médicos, biólogos, agrónomos y veterinarios en América Latina, España y muchos otros países. El Dr. De Robertis fue un destacado científico. Sus dos mayores descubrimientos fueron la liberación de hormonas tiroideas por proteasas y la identificación, aislamiento y demostración de que las vesículas sinápticas controlan la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso. Como director del Instituto de Biología Celular (1957-1988), que hoy lleva su nombre, contribuyó a la educación de incontables estudiantes e investigadores en su querida Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

La presente es la duodécima edición de su famoso texto. Durante los diez años que la separan de la edición anterior, la biología celular y molecular incorporó un número enormemente grande de conocimientos nuevos. Estos no sólo produjeron consecuencias cuantitativas sino también cualitativas, ya que permitieron confirmar la idea largamente sostenida de que la célula es una entidad biológica estructural y funcionalmente integrada, en la que cada particularidad influye sobre las demás y a la vez depende de ellas. Creemos que las innovaciones introducidas en la actual edición incluyen muchos de esos avances. El lector podrá apreciar el empeño puesto para lograr el equilibrio adecuado entre los conocimientos tradicionales y los nuevos. Así, todos los puntos de la edición anterior fueron detenidamente evaluados con el fin de mantener los que, sin ser novedosos, han probado ser verdaderos y por lo tanto ineludibles para ayudar a comprender a los incorporados con posterioridad.

En varios capítulos se eliminaron tablas y figuras consideradas no imprescindibles. Otras fueron actualizadas o directamente reemplazadas. Hemos evitado agregar, e incluso mantener, excesivos detalles metodológicos y experimentales sobre cómo se llegó al conocimiento de una estructura o de una función celular dada. De hacerlo, el libro prácticamente hubiera duplicado el número de páginas. Si bien para muchos docentes y especialistas ello puede constituir una pér-

dida, creemos que beneficiará a los estudiantes, que requieren un texto con conceptos profundos pero de ágil lectura, que no distraiga por la vastedad informativa sobre temas técnicos. No obstante, al final de cada capítulo los interesados podrán encontrar una larga lista de referencias bibliográficas sobre los trabajos de investigación —antiguos y nuevos— que contienen esa clase de información. Más aún, en el capítulo 3 se describen los métodos generales de investigación usados en el campo de la biología celular y molecular. Por razones de organización, en sus últimas secciones se han incluido los métodos más comunes para el análisis molecular del ADN y algunos utilizados por la ingeniería genética, cuya lectura deberá ser precedida por el estudio de los capítulos dedicados al gen y su actividad. Para la actualización de la sección correspondiente a los métodos inmunohistoquímicos contamos con el asesoramiento del Dr. Gabriel Magariños, cuya participación agradecemos.

Varias partes del capítulo 2, en especial las correspondientes a los hidratos de carbono y los lípidos, fueron actualizadas y ampliadas, mientras que otras fueron transferidas a capítulos más afines.

El capítulo de membrana celular fue ampliado, en especial en lo referido a sus propiedades de permeabilidad y a sus mecanismos de transporte. En el capítulo de matriz citoplasmática y citoesqueleto se incorporaron conceptos importantes, particularmente sobre la biología celular y molecular del músculo, que constituían un capítulo independiente en la edición anterior. La superficie celular es objeto de un tratamiento independiente, que incluye las diferenciaciones de membranas, las relaciones físicas de las células entre sí y de ellas con las matrices extracelulares. Otro nuevo capítulo es el correspondiente a la señalización intercelular, en el que se tratan los mecanismos de recepción, transducción y amplificación de esas señales. El caso específico de la comunicación neural, que en la anterior edición se analizaba independientemente, se asimiló a este capítulo. El sistema de endomembranas celulares y los mecanismos de endocitosis y exocitosis relacionados con ellas son tratados como una unidad en un único capítulo, el octavo.

El capítulo 9 ha sido escrito de nuevo. El conocimiento detallado que en la actualidad se tiene de cada estructura de la mitocondria a nivel molecular ha simplificado su descripción. Esto es común en las ciencias biológicas: cuanto más se avanza en el conocimiento de un objeto, más fácilmente se lo puede describir. Por ello hemos preferido abordar el estudio de este organoide con un enfoque diferente del anterior, que esperamos resulte más comprensible. Respecto de su función energética, fue analizada en el contexto de los procesos metabólicos generales, a partir del ingreso de las sustancias nutritivas en el organismo. Por otra parte, debido a su singularidad morfofuncional, el peroxisoma —ciertamente ajeno al sistema de endomembranas— hubiera merecido un capítulo propio, lo cual es editorialmente desaconsejable por la brevedad de su descripción; ha sido incluido en este capítulo porque su biogénesis y la de la mitocondria tienen varios puntos en común.

La organización del capítulo 10, dedicado al núcleo interfásico, ha sido modificada. Se puso especial énfasis en la descripción de la envoltura nuclear y sus poros; la importancia de éstos en el tránsito nucleocitoplasmático atrae la atención de muchos investigadores. Además, luego de la descripción de los cromosomas consideramos oportuno incluir la del cariotipo, antes que hacerlo en el capítulo sobre citogenética. Dada la gran cantidad de información antigua y nueva acumulada sobre los distintos tipos de genes y sus componentes, hemos concentrado el contenido de estos temas en el capítulo 11, donde el lector podrá adquirir los conocimientos que le permitirán comprender mejor los capítulos que siguen.

El extraordinario avance de los descubrimientos genéticos nos ha obligado a realizar cambios en la presentación de los temas vinculados con la transcripción del ADN, los cuales son cubiertos por el capítulo 12. Así, ha sido necesario separar la descripción de la síntesis de los distintos tipos de ARN y en cada una analizar su regulación. En la parte final de este capítulo se ha incluido el estudio de la actividad de los genes en las células procariotas, más su regulación cotranscripcional y postranscripcional. El capítulo 13, en el que se explica la traducción de los ARN mensajeros —o la síntesis de las proteínas—, también ha experimentado cambios sustanciales. Este tema se describe como un proceso dinámico modulado por varias regulaciones. Además, se explica de qué manera los distintos grupos de proteínas son conducidos a sus lugares de destino.

También se han efectuado importantes revisiones en el capítulo 14, dedicado a la replicación del ADN. Se han reordenado sus secciones y agregado diversos temas basados en los nuevos hallazgos sobre las enzimas que participan en la síntesis de la molécula que guarda la información genética. Una mención especial merecen los descubrimientos sobre la replicación del ADN en los télómeros, que ayudarían a explicar los procesos de envejecimiento celular y de aparición de algunos tipos de cánceres. El capítulo concluye con el análisis de las mutaciones que suele sufrir el ADN, las formas como se reparan y la eventual transposición de algunas secuencias en esa molécula.

El estudio de la reproducción celular, dividido en los capítulos 15 y 16, dedicados respectivamente a la mitosis y la meiosis, comienza con la descripción general de ambos procesos, los cuales son posteriormente ampliados con el análisis de los fenómenos moleculares que los sustentan. En el capítulo 15 se incluyen los nuevos conocimientos sobre el control del ciclo celular y las moléculas que lo regulan, sin omitir a los protooncogenes y sus versiones defectuosas, los oncogenes. Rematando el estudio de la meiosis —proceso que lleva a la formación de las células germinativas—, en la parte final del capítulo 16 se describen los pasos de la fecundación, al cabo de la cual comienza el desarrollo embrionario. La profundidad con que pudimos exponer este tema no es posible en libros de embriología debido a que el estudiante lo aborda en las primeras clases, cuando todavía carece de algunos conocimientos esenciales que aprende en los cursos de biología celular.

Los temas correspondientes a la citogenética general y a la citogenética humana, anteriormente en sendos capítulos, fueron resumidos y reunidos en el capítulo 17. Debido a la expansión experimentada por estas disciplinas, su profundización requiere la lectura de textos sobre genética.

Entre los temas más atrayentes en el campo de la biología molecular actual se hallan los vinculados con la diferenciación celular, tanto los concernientes a la transformación individual de las células como los que describen los procesos que llevan a la formación del cuerpo. Es por ello que en los últimos años numerosos aspectos de la diferenciación han sido investigados a un ritmo vertiginoso y desde los más diversos ángulos, lo cual ha permitido descubrir facetas absolutamente ignoradas hasta hace poco tiempo. Con las restricciones lógicas derivadas del poco espacio que ofrece un texto dirigido principalmente a los estudiantes, en el capítulo 18 han sido volcados muchos de esos avances. El mismo capítulo incorpora otro tema saliente, el de la muerte celular programada, cuya génesis y regulación han comenzado a comprenderse.

El libro concluye con el estudio de la célula vegetal, desarrollado en el capítulo 19. Sus secciones han sido ampliamente revisadas, en especial las correspondientes al cloroplasto y a las reacciones químicas de la fotosíntesis.

El incesante progreso en el conocimiento de las estructuras celulares ha obligado a modificar el título de este libro varias veces. Al nacer, en 1946, llevó la denominación de Citología General. Ese nombre fue sustituido a partir de la sexta edición por el de Biología Celular, que fue vuelto a cambiar en la décima edición por el de Biología Celular y Molecular. Ante la desaparición física de su inspirador, consideramos que el título de la actual edición debía contener su nombre, de ahí que el libro ahora se denomine Biología Celular y Molecular de De Robertis.

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a la Editorial El Ateneo por la confianza depositada en nosotros y el apoyo recibido para realizar esta edición, en particular a su vicepresidente, el Dr. Eustasio García. También al Sr. Enrique Lohrmann, quien tuvo la tarea de coordinar nuestra labor y salvar las inevitables dificultades que surgen durante la elaboración de una obra de esta envergadura. En tal sentido, la participación del Sr. Carlos Ferrero ha sido igualmente inestimable. Una mención especial merecen los Sres. Esteban Mas y Julio Cortés. El Sr. Mas es autor de la mayor parte de las ilustraciones, que creemos serán de gran ayuda para comprender muchos pasajes del libro. Por su lado, el Sr. Cortés tuvo a su cargo la revisión y diagramación del texto, tareas que realizó con una idoneidad y precisión encomiables. También agradecemos el aporte brindado por el Dr. Carlos Galli Mainini y la colaboración del Sr. Juan Carlos Martínez.

Es nuestro anhelo que el esfuerzo puesto en la realización de este libro sirva para acercar al lector al maravilloso universo de la célula.

Eduardo M. F. De Robertis

José Hib

Roberto Ponzio

Indice

1. LA CELULA	1
Introducción	1
Niveles de organización	2
Historia de la biología celular y molecular	3
Características generales de la célula	5
 2. COMPONENTES QUIMICOS DE LA CELULA	 21
Introducción	21
Agua y minerales	22
Acidos nucleicos	23
Hidratos de carbono	28
Lípidos	30
Proteínas	33
Enzimas	38
Origen de la célula	41
 3. METODOS DE ESTUDIO EN BIOLOGIA CELULAR	 45
Microscopia óptica	45
Microscopia electrónica	50
Cultivo de tejidos	55
Citometría de flujo	57
Preparación de tejidos	57
Citoquímica e histoquímica	62
Radioautografía	68
Fraccionamiento celular	69
Análisis molecular del ADN e ingeniería genética	71
 4. MEMBRANA CELULAR	 81
Composición molecular	81
Fluidez de las membranas	91
Esqueleto membranoso	94
Permeabilidad de membrana	96

5. MATRIZ CITOPLASMATICA Y CITOESQUELETO	103
Matriz citoplasmática y citoesqueleto	103
Microtúbulos	106
Organoides microtubulares	116
Microfilamentos	126
Biología celular y molecular del músculo	136
Filamentos intermedios	150
 6. SUPERFICIE CELULAR	 155
Diferenciaciones de la membrana celular	155
Interacciones de las células entre sí y con las matrices extracelulares . .	169
 7. SEÑALIZACION INTERCELULAR	 182
Recepción, transducción y amplificación de las señales intercelulares . .	182
Biología celular y molecular de la comunicación neural	190
Transmisión sináptica y estructura de la sinapsis	192
Vesículas sinápticas y liberación cuántica del neurotransmisor	199
Receptores sinápticos y respuesta fisiológica	207
Organización general de las fibras nerviosas. Transporte axónico	214
 8. SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS	 221
Morfología general del sistema de endomembranas	221
Retículo endoplasmático	223
Aparato de Golgi	239
Secreción de proteínas por la célula	248
Lisosomas	256
Endocitosis, fagocitosis y pinocitosis	263
Vesículas con cubierta	267
 9. MITOCONDRIAS. PEROXISOMAS	 274
Mitocondrias	274
Procesos bioenergéticos	275
Descripción general y estructura	279
Función energética	281
Otras funciones	286
Reproducción	286
ADN mitocondrial	287
Peroxisomas. Descripción y funciones	290
 10. NUCLEO INTERFASICO	 293
Descripción general	293
Envoltura nuclear	295
Cromosomas	296
Nucleosomas	298
Eucromatina y heterocromatina	300
Cariotipo	301

11. ESTRUCTURA DE LOS GENES	307
Introducción	307
Intrones y exones	308
Código genético	309
Composición de los genes	310
12. TRANSCRIPCION DEL ADN	315
Definición	315
Síntesis del ARN mensajero	317
Regulación de los genes que codifican el ARNm	318
Procesamiento del ARNm	325
Síntesis del ARN ribosómico 45S	330
Nucléolo	333
Síntesis del ARN ribosómico 5S	333
Síntesis del ARN de transferencia	334
Regulación de la actividad genética de las células procariotas	335
13. TRADUCCION DEL ARN	341
Descripción general	341
Tipos de ARN de transferencia	341
Estructura de los ARNt	342
Ribosomas	344
Ensamblaje de los ribosomas	345
Las etapas de la síntesis proteica	346
Regulación de la traducción del ARNm y de la degradación de las proteínas	351
14. REPLICACION DEL ADN	355
Introducción	355
Descripción general y enzimas participantes	356
Orígenes de replicación	358
Replicación continua y discontinua	360
Replicación del ADN en los telómeros	362
Funciones de las topoisomerasas	363
Mutación del ADN	366
Reparación del ADN	368
Transposición de secuencias de ADN	369
15. MITOSIS. CONTROL DEL CICLO CELULAR	373
Ciclo celular	373
Descripción general de la mitosis	375
Ciclo de los centrosomas	378
Cinetocoros	378
Fibras del huso mitótico	379
Bases biofísicas de la mitosis	381
Citocinesis	381
Control del ciclo celular	383
Protooncogenes y oncogenes	386

16. MEIOSIS. FECUNDACION 390
Meiosis y reproducción sexual 390
Diferencias entre la mitosis y la meiosis 390
Descripción general 391
Consecuencias genéticas de la meiosis 404
Fecundación 407
Fases de la fecundación 408

17. CITOGENETICA 414
Leyes de la herencia mendeliana 414
Aberraciones cromosómicas 418
Aberraciones cromosómicas en la especie humana 420
Papel de los cromosomas en la evolución 424

18. DIFERENCIACION CELULAR. MUERTE CELULAR 426
Diferenciación celular. Características generales 426
Interacciones nucleocitoplasmáticas 427
Determinantes citoplasmáticos 429
Valores posicionales de las células embrionarias 432
Establecimiento del plan corporal 432
Fenómenos inductivos 433
Genes responsables de la formación del plan corporal 436
Inmunología molecular 438
Muerte celular. Factores desencadenantes 441

19. LA CELULA VEGETAL. CLOROPLASTOS 445
Pared de las células vegetales 445
Citoplasma 447
Cloroplasto y otros plástidos 448
Biogénesis de los cloroplastos 451
Fotosíntesis 453
Reproducción de las plantas y multiplicación de las células vegetales 458

INDICE ALFABETICO 461

1 / La célula

Eduardo De Robertis

INTRODUCCION

1-1. Las células son los bloques con que se construyen todas las formas de vida

El estudio del universo viviente nos muestra que la evolución produjo una inmensa diversidad de formas. Existen alrededor de cuatro millones de distintas especies de bacterias, protozoos, vegetales y animales, cuya morfología, función y comportamiento son diferentes. Sin embargo, si estudiamos a los organismos vivientes a nivel celular y molecular, exhiben un plan maestro de organización único. El campo de la biología celular y molecular es, precisamente, ese plan de organización unificado; en otras palabras, es el análisis de las moléculas y células que constituyen los bloques con los cuales se construyen todas las formas de vida.

Los antiguos filósofos y naturalistas —en especial Aristóteles en la Edad Antigua y Paracelso en el Renacimiento— llegaron a la conclusión de que “todos los animales y vegetales, por más complicados que sean, están constituidos por unos pocos elementos que se repiten en cada uno de ellos”. Se referían a las estructuras macroscópicas de un organismo, como las raíces, hojas y flores comunes a diferentes vegetales, o a los segmentos y órganos que se repiten en el reino animal. Muchos siglos después, gracias a la invención de las lentes de aumento, se descubrió un mundo de dimensiones microscópicas. Se vio así que una célula aislada puede constituir un organismo entero —como en el caso de los protozoos—, o bien agruparse y diferenciarse en tejidos y órganos para formar un organismo multicelular.

Por lo tanto, la célula es una entidad estructural y funcional fundamental de los seres vivos, así como el átomo es la unidad fundamental de las estructuras químicas. Si por medios mecánicos o de otra naturaleza se destruye la organización celular,

la función de la célula también se altera. Aun cuando pueden persistir algunas funciones vitales (la actividad enzimática, por ejemplo), la célula pierde su significado como unidad organizada y muere.

Los estudios bioquímicos demostraron que la materia viviente está compuesta por los mismos elementos que constituyen el mundo inorgánico, aunque puede haber diferencias fundamentales en su organización. En el mundo inanimado existe la tendencia continua a un equilibrio termodinámico con una contribución al azar de materia y energía, mientras que en un organismo vivo se mantiene un alto grado de estructura y función durante la transformación de la energía y la materia, basada en el ingreso y egreso constante de éstas. Los bioquímicos aislaron de mezclas complejas de constituyentes celulares, además de componentes inorgánicos, moléculas mucho más complejas, como proteínas, grasas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos. Estos estudios bioquímicos demostraron también la existencia de una unidad básica en todo el mundo viviente. En la actualidad sabemos que la maquinaria bioquímica es esencialmente la misma en cuanto a su estructura y función, y que todos los seres vivos poseen el mismo código genético.

En las últimas décadas la microscopía electrónica permitió obtener mayores conocimientos sobre la estructura de las células y descubrir todo un mundo de organización subcelular que llega al nivel molecular. Por otro lado, los métodos de fraccionamiento celular proporcionaron el medio de separar los diversos organoides subcelulares y de estudiarlos mediante las poderosas técnicas de la bioquímica y la biología molecular.

El principal objetivo de este capítulo es ofrecer una introducción al estudio de la estructura celular y presentar la nomenclatura de los componentes de la célula. Ello tiene máxima importancia para comprender los modernos conceptos sobre biología ce-

lular y molecular desarrollados en el resto del libro. Después de mencionar los niveles de organización en biología, se considerarán algunos aspectos históricos, haciendo referencia a la teoría celular. Describiremos la organización estructural de los dos tipos principales de organismos vivos —los procariorias y los eucariotas—, señalando sus semejanzas y diferencias. Este capítulo también introducirá al lector en la estructura del núcleo, el ciclo vital de la célula y los procesos de división mitótica y meiótica, para terminar con una breve descripción de la ultraestructura del citoplasma y de los principales organoides. Mediante la atenta lectura de este capítulo el estudiante tendrá una perspectiva general de la célula, como base del aprendizaje del material presentado en el resto del libro.

NIVELES DE ORGANIZACION

1-2. Niveles de organización en biología celular y molecular

La biología, en general, trata de la compleja jerarquía o niveles de organización que van desde la célula a las poblaciones y ecosistemas.

Los modernos estudios de la materia viviente demuestran que una serie de niveles de organización integrados dan por resultado las manifestaciones vitales del organismo. El concepto de los niveles de organización implica que en el universo entero, tanto en el mundo inerte como en el viviente, hay diversos niveles de complejidad, de manera que las leyes o reglas que se encuentran en un nivel pueden no aparecer en niveles inferiores.

Este concepto puede aplicarse a las diferentes partes estructurales de una célula o a la asociación de numerosas células en un tejido y de diferentes tejidos en un organismo. Por ejemplo, todos los vertebrados están compuestos por un número limitado de tipos celulares (células musculares, epiteliales, nerviosas, etc.), que se encuentran en diferentes proporciones para producir una enorme variedad de esos organismos.

La diversidad del mundo viviente depende, en última instancia, de un programa genético codificado por los ácidos nucleicos, que es ejecutado por medio de complejos circuitos reguladores que controlan las actividades bioquímicas de las células. La biología molecular ha demostrado que las características de los diferentes tipos celulares se basan en su estructura y en los componentes moleculares que son el resultado de la expresión de los genes.

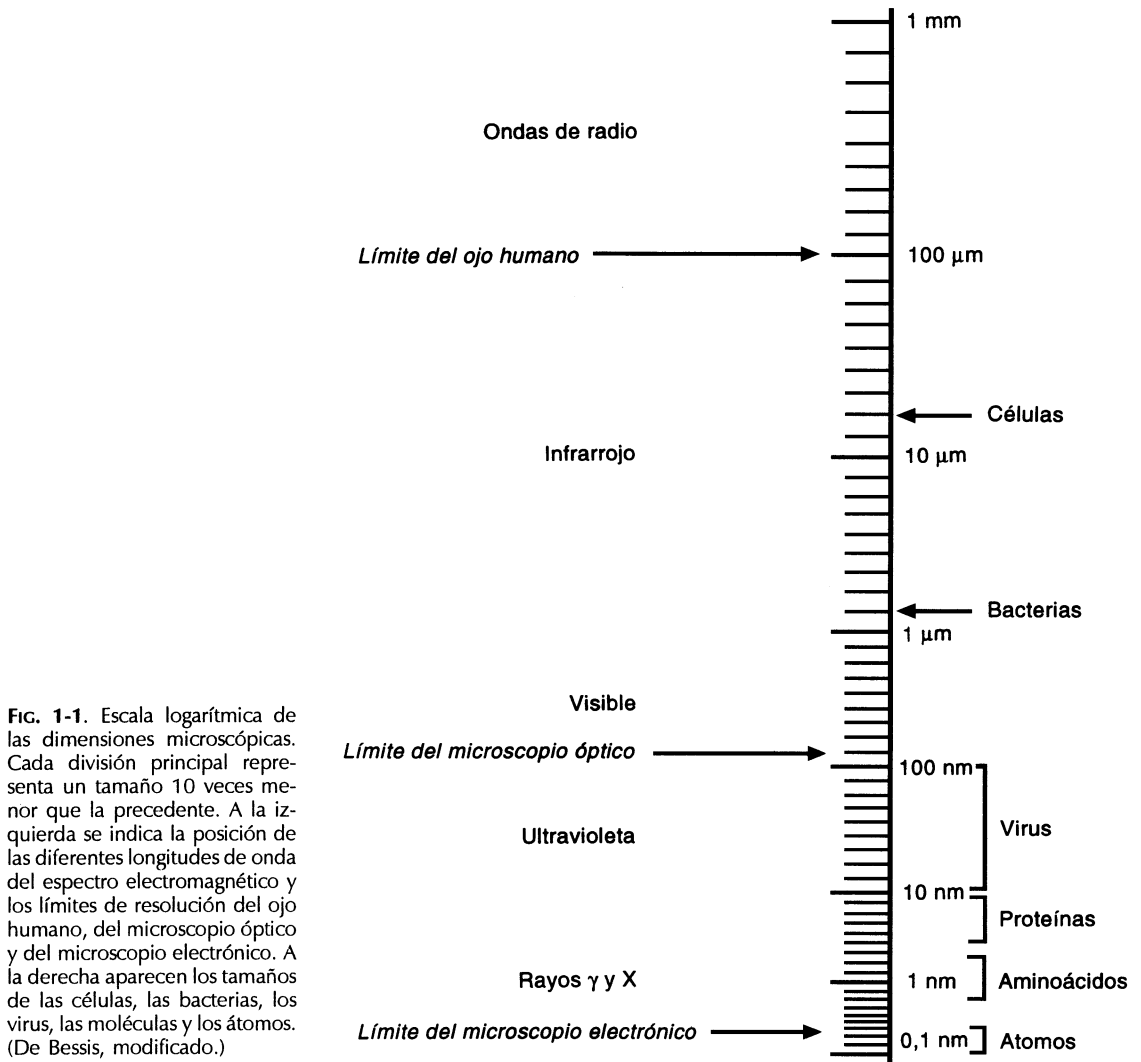
1-3. Niveles de organización y poder resolutivo de los instrumentos utilizados

La tabla 1-1 muestra los límites que separan el estudio de los sistemas biológicos en diferentes niveles de dimensión. Los límites están impuestos artificialmente por el poder de resolución de los instrumentos utilizados. El ojo humano sólo puede resolver (discriminar) dos puntos separados por más de 0,1 mm (100 µm). La mayoría de las células son mucho menores y necesitan todo el poder de resolución del microscopio óptico (0,2 µm) para ser estudiadas. La mayor parte de las estructuras celulares son más pequeñas aún y requieren la resolución del microscopio electrónico (fig. 3-7). Con este importante instrumento se puede obtener una información directa de estructuras que oscilan entre 0,4 y 200 nm, lo cual amplía nuestro campo de observación hasta el mundo de las macromoléculas. Los resultados obtenidos por medio de la aplicación de la microscopia electrónica han cambiado el campo de la citología en un grado tal que gran parte de este libro está dedicado al estudio de los conocimientos obtenidos con esta técnica. Por último, se realizan estudios de la configuración molecular de proteínas, ácidos nucleicos y otros complejos moleculares de gran tamaño —como algunos virus— mediante análisis detallados por difracción de rayos X.

En la figura 1-1 se indican los tamaños de las diferentes células, bacterias, virus y moléculas en escala logarítmica, y se los compara tanto con las longitudes de onda de distintas radiaciones como

TABLA 1-1. Ramas de la morfología

Dimensión	Rama	Estructura	Método
0,1 mm (100 µm) y más	Anatomía	Organos	Ojo y lente simple
100-10 µm	Histología	Tejidos	Varios tipos de microscopios
10-0,2 µm (200 nm)	Citología	Células	ópticos
		Bacterias	Microscopia de rayos X
200-1 nm	Morfología submicroscópica	Componentes celulares	Microscopia de polarización
	Ultraestructura	Virus	Microscopia electrónica
Menos de 1 nm	Biología molecular		
	Estructura molecular y atómica	Disposición de los átomos	Difracción de rayos X



con los límites de resolución del ojo, el microscopio óptico y el microscopio electrónico. Puede advertirse que el microscopio óptico introduce un aumento de 500 veces en la resolución del ojo y el microscopio electrónico un aumento 500 veces mayor que el microscopio óptico.

En la tabla 1-2 se presentan las relaciones generales entre algunas de las dimensiones lineales y los pesos utilizados en los diferentes campos de análisis químico de la materia viviente. Es esencial familiarizarse con estas relaciones para el estudio de la biología celular y molecular. El peso de los componentes importantes de la célula se expresa en *pico-gramos* (1 pg = 1 μg , o sea, 10^{-12} g) y el de las moléculas en dalton. Un dalton (Da) es igual al peso de un átomo de hidrógeno, pero frecuentemente se utiliza el múltiplo kilodalton (1 kDa = 1.000 Da). Por ejemplo, una molécula de agua pesa 18 Da y una de hemoglobina 64,5 kDa.

HISTORIA DE LA BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

1-4. Desarrollo de la teoría celular

El establecimiento de la teoría celular —que en esencia postula que todos los organismos vivos están compuestos por células y productos celulares— fue la consecuencia de muchas investigaciones iniciadas en el siglo XVII con el desarrollo de las lentes ópticas y su combinación para construir el microscopio compuesto (del griego *mikros*, pequeño, y *skopein*, ver). El nombre de célula (del griego *kytos*, célula, y del latín *cella*, espacio vacío) fue empleado por primera vez por Robert Hooke (1655) para describir sus investigaciones sobre “la textura del corcho por medio de lentes de aumento”. En estas observaciones, repetidas por Grew y Malpighi en diversos vegetales, se examinaron solamente las cavidades (“utrículos” o “vesículas”) de la pared ce-

TABLA 1-2. Relaciones entre las dimensiones lineales y los pesos

Dimensión lineal	Peso	Terminología
1 cm	1g	Bioquímica convencional
1 mm	1 mg, 10 ⁻³ g	Microquímica
100 μm	1 μg, 10 ⁻⁶ g	Histoquímica
1 μm	1 pg, 10 ⁻¹² g	Citoquímica } Ultramicroquímica

lular. En el mismo siglo y al comienzo del siguiente, Leeuwenhoek (1674) descubrió células libres, en oposición a las células “empotradas” de Hooke y Grew, y observó cierta organización dentro de ellas, en especial el núcleo en eritrocitos de algunos animales. Este conocimiento de la célula permaneció estacionario por más de una centuria.

A principios del siglo XIX se realizaron varios descubrimientos acerca de la estructura de los tejidos vegetales y animales que llevaron finalmente al botánico Schleiden (1838) y al zoólogo Schwann (1839) a formular la teoría celular de manera más definida. Luego del descubrimiento del núcleo en todas las células efectuado por Brown (1831) y de la descripción del contenido celular, el concepto de célula se transformó en el de una masa de protoplasma limitada en el espacio por una membrana celular y que posee núcleo. El protoplasma que rodea al núcleo fue denominado citoplasma, para diferenciarlo del carioplasma o protoplasma del núcleo.

En 1855 Virchow amplió la teoría celular al expresar en su famoso aforismo *Omnis cellulae e cellula* (es decir, “todas las células se originan en células preexistentes”), estableciendo la división celular como el fenómeno central en la reproducción de los organismos. Años después se demostró que las células aseguran la continuidad entre una generación y otra por medio del mecanismo de mitosis (Flemming, 1880) y la división de los cromosomas (Waldeyer, 1890).

Otro importante descubrimiento fue el del comienzo del desarrollo de un embrión por la fusión de dos núcleos, uno procedente del óvulo y el otro del espermatozoide, durante la fecundación (Hertwig, 1875). Antes de fines de siglo había quedado establecido que los gametos (óvulo y espermatozoide) se forman por división reduccional —que más adelante se denominó meiosis—, por medio de la cual el número de cromosomas de una especie se mantiene constante de generación en generación.

Todos estos descubrimientos permitieron llegar a la versión moderna de la teoría celular, que afirma que: 1) las células constituyen las unidades morfológicas y fisiológicas de todos los organismos vivos; 2) las propiedades de un organismo dado dependen de las células individuales; 3) las células se

originan únicamente a partir de otras células y su continuidad se mantiene a través del material genético; y 4) la unidad más pequeña de la vida es la célula.

1-5. Desarrollo de la biología celular submicroscópica y molecular

Al estudiar los límites y dimensiones en biología (tablas 1-1 y 1-2) se mencionó la importancia del análisis instrumental y se delinearon los modernos campos de la estructura y de la biología molecular. Estas son las ramas más progresistas de la biología celular, en las cuales la combinación de la citología se ha dado gradualmente con la bioquímica, la fisicoquímica y, en especial, con la química macromolecular y coloidal. El conocimiento de la organización submicroscópica de la célula (o ultraestructura) es de interés fundamental, porque prácticamente todas las transformaciones funcionales y fisiológicas se producen en la arquitectura molecular de sus componentes.

Podemos atribuir el rápido desarrollo de la biología celular y molecular en el siglo actual a dos factores principales: 1) el mayor poder de resolución que proporcionan la microscopía electrónica y la difracción de rayos X; y 2) la convergencia en este terreno con otras ramas de la investigación biológica, en especial la genética, la fisiología y la bioquímica. El aporte de la genética es por demás ilustrativo.

En 1865 Gregorio Mendel descubrió las leyes fundamentales de la herencia, pero en ese entonces no se conocían los cambios citológicos que tienen lugar en las células sexuales como para poder interpretar sus observaciones. Por esta y por otras razones se prestó muy poca atención a los trabajos de Mendel hasta que, en 1901, los botánicos Correns, Tschermak y De Vries volvieron a descubrir, independientemente, las leyes de Mendel. En esa época la citología había avanzado lo suficiente como para comprender y explicar el mecanismo de distribución de las unidades hereditarias propuesto por Mendel. Por último, Morgan y sus colegas establecieron la teoría cromosómica de la herencia, la que atribuyó a los genes (Johanssen), o unidades hereditarias, *loci* específicos dentro de

los cromosomas. De este modo, debido a la convergencia de la citología con la genética se originó la citogenética (cap. 17).

En la última década se vinculó el estudio de la genética con la bioquímica, relacionando los fenómenos que tienen lugar a nivel molecular. Aun cuando Miescher (1871) ya había aislado la “nucleína” —molécula que en la actualidad se conoce como ácido desoxirribonucleico o ADN— de núcleos de eritrocitos, no se le concedió importancia como material genético hasta la década de 1950. Hasta entonces se consideraba que las proteínas nucleares eran los principales componentes de los genes. Ese concepto debió ser modificado cuando se identificaron los ácidos nucleicos como portadores de la información genética, en especial a la luz de los trabajos de Watson y Crick (1953), quienes propusieron el modelo de la doble hélice del ADN. Este modelo mostraba claramente de qué manera los genes podían duplicarse y transmitirse de una célula a las células descendientes (caps. 14 y 15). Desde entonces los adelantos en biología molecular fueron extraordinarios. Se llegó a otro momento culminante cuando se descifró el código genético (Nirenberg, Ochoa) y se descubrieron los mecanismos moleculares por Yddio de los cuales son transcritos los genes y sintetizadas las proteínas. En la actualidad gran parte del interés de las investigaciones en biología celular y molecular está centrado en los mecanismos que regulan la expresión de los genes.

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS CELULAS

1-6. Existen células procariotas y eucariotas

Al comienzo de este capítulo dijimos que la vida se manifiesta en millones de especies diferentes que poseen una morfología especial y propia y que contienen información genética específica. Podemos ordenar las especies en grupos de organismos cada vez más amplios —géneros, familias, órdenes— hasta llegar al nivel de los reinos clásicos: vegetal y animal. Una de las clasificaciones más recientes —la de Whittaker— propone la división

en cinco reinos: *móneras*, *protistas*, *hongos*, *vegetales* y *animales*, con sus correspondientes subdivisiones.

Podemos simplificar este cuadro tan complejo si examinamos las formas vivientes a nivel celular. Es posible identificar a las células entre dos tipos reconocibles: *procariotas* y *eucariotas*. En la tabla 1-3 se aprecia que únicamente las móneras (es decir, bacterias y algas azules) son células procariotas, mientras que todos los demás miembros están formados por organismos compuestos por células eucariotas. La principal diferencia entre ambos tipos celulares es que los procariotas no tienen envoltura nuclear. El cromosoma procariótico ocupa un espacio dentro de la célula denominado nucleoide, y se halla en contacto directo con el resto del protoplasma. Las células eucariotas poseen un núcleo verdadero con una complicada envoltura nuclear, a través de la cual tienen lugar los intercambios nucleocitoplasmáticos. En la tabla 1-4 se establece la comparación de la organización estructural en procariotas y eucariotas, lo cual ilustra las diferencias y las semejanzas entre estos dos tipos celulares.

Desde el punto de vista evolutivo, se considera que los procariotas son antecesores de los eucariotas. Los fósiles que datan de tres mil millones de años se manifiestan únicamente como procariotas, en tanto que los eucariotas aparecieron probablemente hace mil millones de años. A pesar de las diferencias entre procariotas y eucariotas, hay semejanzas importantes en su organización molecular y en sus funciones. Por ejemplo, todos los organismos vivos utilizan el mismo código genético y una maquinaria similar para la síntesis de proteínas.

1-7. Tipos de células y ciclo energético

El sol constituye la fuente original de energía para los organismos vivos. La energía incluida en los fotones es atrapada por el pigmento clorofila, que se encuentra en los cloroplastos de los vegetales verdes y se acumula en forma de energía química en los diferentes alimentos consumidos por otros organismos.

Podemos agrupar a todas las células y organismos en otras dos clases principales, basándonos en el

TABLA 1-3. Clasificación de los organismos y las células

Reino	Móneras	Protistas	Hongos	Vegetales	Animales
Organismos representativos	Bacterias Algas azules	Protozoos Crisofitas	Mohos Hongos verdaderos	Algas verdes Algas rojas Algas pardas Briofitas Traqueofitas	Metazoos
Clasificación celular	Procariotas	←————— Eucariotas —————→			

TABLA 1-4. Organización celular en procariotas y eucariotas

	<i>Células procariotas</i>	<i>Células eucariotas</i>
<i>Envoltura nuclear</i>	Ausente	Presente
<i>ADN</i>	Desnudo	Combinado con proteínas
<i>Cromosomas</i>	Unicos	Múltiples
<i>Nucléolos</i>	Ausentes	Presentes
<i>División</i>	Amitosis	Mitosis o meiosis
<i>Ribosomas</i>	70S* (50S + 30S)	80S (60S + 40S)
<i>Endomembranas</i>	Ausentes	Presentes
<i>Mitocondrias</i>	Enzimas respiratorias y fotosintéticas en la membrana plasmática	Presentes
<i>Cloroplastos</i>	Ausentes	Presentes en células vegetales
<i>Pared celular</i>	No celulósica	Celulósica en células vegetales
<i>Exocitosis y endocitosis</i>	Ausentes	Presentes
<i>Locomoción</i>	Fibrilla única, flagelo	Cilios y flagelos

* S corresponde a unidades Svedberg de sedimentación, que dependen del tamaño molecular.

mecanismo que utilizan para extraer energía para su propio metabolismo. Los que pertenecen a la primera clase —denominados *autótrofos* (por ejemplo, los vegetales verdes)— utilizan el proceso

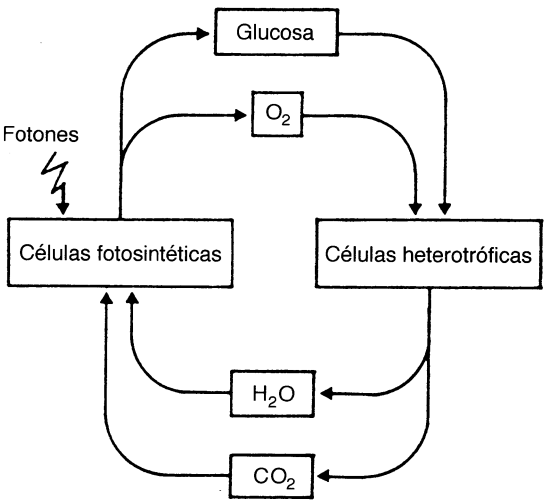


FIG. 1-2. Esquema del ciclo de la energía entre las células autótrofas (fotosintéticas) y heterótrofas.

de fotosíntesis para transformar CO₂ y H₂O en hidratos de carbono, a partir de los cuales se producen moléculas más complejas. La segunda clase de células —u organismos *heterótrofos* (por ejemplo, las células animales)— obtienen la energía de diversos hidratos de carbono, grasas y proteínas sintetizados por los organismos autótrofos. La energía que contienen estas moléculas orgánicas es liberada principalmente mediante la combustión del O₂ atmosférico (es decir, por oxidación), en un proceso que se denomina respiración aeróbica. La liberación de H₂O y CO₂ por los organismos heterótrofos completa el ciclo energético (fig. 1-2).

Estos ciclos energéticos se han mantenido relacionados entre sí durante la evolución. Dentro de las móneras procariotas existen algunas especies que son autótrofas y otras heterótrofas. Por ejemplo, las bacterias y las algas azules fotosintéticas absorben los nutrientes solubles del medio. Los hongos y los animales son heterótrofos, mientras que los vegetales (con excepción de algunas especies) son autótrofos.

1-8. Organización general de las células procariotas

Si bien este libro está dedicado al estudio de las células eucariotas más complejas, es interesante señalar que gran parte de nuestro conocimiento actual en biología celular proviene de estudios en virus y bacterias. Una célula bacteriana, como la *Escherichia coli*, presenta la ventaja de su fácil cultivo en una solución acuosa de glucosa y algunos iones inorgánicos. En este medio, a 37°C, duplica su masa celular y se divide aproximadamente en 60 minutos. Este lapso puede ser reducido a 20 minutos si se agregan al medio nucleótidos y aminoácidos.

Como se muestra en la microfotografía electrónica de la figura 1-3, las bacterias están rodeadas por dos membranas muy bien definidas, separadas por el *espacio periplasmático*. La membrana externa es rígida, sirve de protección mecánica y se denomina *pared celular*. La composición química de esta pared es bastante compleja, y contiene polisacáridos, lípidos y proteínas. Una de las proteínas más abundantes recibe el nombre de *porina* y forma canales que permiten la difusión de los solutos. En la figura 1-3 aparece un esquema de la pared celular de una bacteria con la posible disposición de los canales de porina, formados por unidades proteicas que abarcan todo el grosor de la membrana externa. En la parte inferior de la figura se aprecian algunas proteínas unidas a un retículo de peptidoglicanos, que se encuentran en el espacio periplasmático.

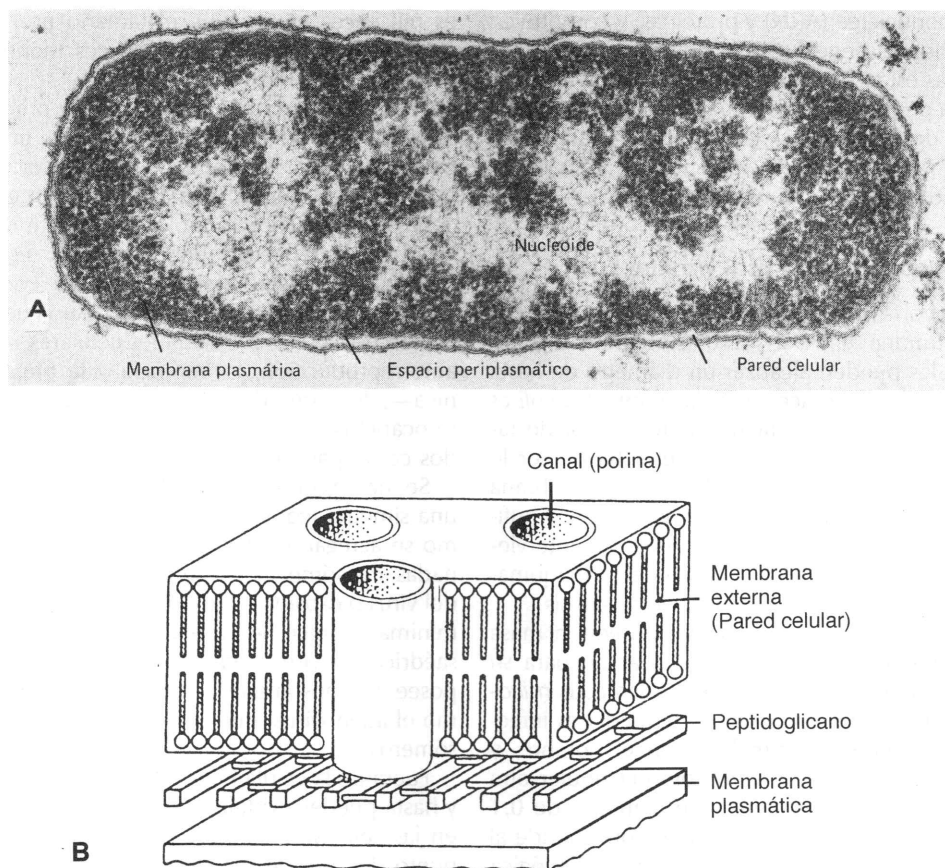


FIG. 1-3. A. Micrografía electrónica de una *Escherichia coli* que muestra la pared celular, el espacio periplasmático y la membrana plasmática. El nucleóide aparece como una región irregular de poca densidad electrónica en la cual pueden verse los filamentos de ADN. El resto del protoplasma está ocupado por gránulos densos que representan ribosomas. (Cortesía de B. Menge, M. Wurtz y E. Kellenberger.) B. Esquema de la pared celular de una bacteria gramnegativa. Obsérvense los canales de porina, formados por unidades proteicas que atraviesan la bicapa lipídica. En el espacio periplasmático se indica la presencia de un retículo de peptidoglicanos. La membrana plasmática aparece en la parte inferior de la figura.

La membrana interna —llamada también *membrana plasmática*— es una estructura lipoproteica que sirve de barrera para elementos situados en el medio circundante. Esta membrana, al controlar la entrada y salida de solutos, contribuye al establecimiento de un medio perfectamente regulado en el protoplasma de la bacteria. Es interesante observar que en los procariotas las enzimas que intervienen en la oxidación de los metabolitos (es decir, la cadena respiratoria), lo mismo que los fotosistemas utilizados en la fotosíntesis, se localizan en la membrana plasmática.

El *cromosoma* bacteriano es una molécula circular única de ADN desnudo, apretadamente plegado dentro del *nucleoide*, el cual, visto con el microscopio electrónico, se observa como la región más clara del protoplasma (fig. 1-4). Es importante recordar que el ADN de la *Escherichia coli*, que tiene una longitud aproximada de 1 mm (10^6 nm), una vez desenrollado contiene toda la información

genética del organismo. Posee la información suficiente como para codificar entre 2.000 y 3.000 proteínas diferentes.

El cromosoma bacteriano se halla unido a la membrana plasmática. Se cree que este punto de fijación contribuiría a la separación de los dos nucleoides hijos después de la replicación del ADN. En efecto, tal separación se produciría al crecer la membrana plasmática interpuesta.

Además del cromosoma, algunas bacterias contienen un pequeño ADN —también circular— denominado *plásmido*. El plásmido puede conferir a la célula bacteriana resistencia a uno o a varios antibióticos. Utilizando técnicas de ingeniería genética (cap. 3-26), es posible separar a los plásmidos, insertar en ellos genes (fragmentos específicos de ADN) y luego trasplantarlos a otras bacterias.

Rodeando al ADN se encuentran unas 25.000 partículas de alrededor de 25 nm de diámetro, denominadas *ribosomas*. Están compuestos por

ácido ribonucleico (ARN) y proteínas, y constituyen el sitio donde tiene lugar la síntesis proteica. Los ribosomas están formados por una subunidad grande y otra pequeña, y se agrupan en *polirribosomas*. El resto de la célula se compone de agua, otros tipos de ARN, proteínas (estructurales y enzimáticas) y moléculas más pequeñas.

1-9. *Micoplasmas, virus y viroides*

La mayoría de las células procariotas son pequeñas (miden entre 1 y 10 μm), pero algunas algas azules pueden alcanzar un diámetro de hasta 60 μm . De lo dicho acerca de la *Escherichia coli* es evidente que debe existir un límite inferior de tamaño para la célula. En efecto, ésta ha de ser lo bastante grande como para: 1) poseer membrana plasmática; 2) contener el material genético suficiente para codificar los diversos ARN que intervienen en la síntesis proteica; y 3) poseer la maquinaria biológica para que tenga lugar esa síntesis.

Entre los organismos vivos que poseen la masa más pequeña, los que mejor se adaptan para su estudio son las pequeñas bacterias llamadas *micoplasmas*, las cuales producen enfermedades infecciosas en diferentes animales y en el hombre, y pueden ser cultivadas *in vitro* como cualquier otra bacteria. Estos agentes tienen un diámetro de 0,1 a 0,25 μm ; por lo tanto, su tamaño corresponde al de algunos virus grandes. La importancia biológica de estos microbios radica en que su masa viviente

es mil veces menor que el tamaño promedio de una bacteria y un millón de veces menor que el de una célula eucariota.

Los virus fueron reconocidos en un principio por su propiedad de atravesar los poros de un filtro de porcelana y por los cambios patológicos que producen en las células. Actualmente, con el microscopio electrónico es posible visualizar e identificar morfológicamente a todos los virus y estudiar su organización macromolecular. No se considera a los virus como células verdaderas. Aun cuando participan de algunas propiedades celulares —como la autorreproducción, la herencia y la mutación génica—, los virus dependen de células huéspedes (procariotas o eucariotas), y por eso son considerados como parásitos obligados.

Se ha observado que muchos virus presentan una simetría icosaédrica. Esta deriva del modo como se agregan ciertas unidades proteicas denominadas *capsómeros* —formadoras de la envoltura del virus o *capside*—, lo que requiere un estado de mínima energía. Se ha encontrado la simetría icosaédrica en virus pequeños como el ϕX174 , que posee 12 capsómeros, y en otros más grandes como el adenovirus, que puede tener hasta 252 capsómeros.

Fuera de la célula huésped los virus son inactivos y hasta pueden cristalizar. Se activan al introducirse en las células, en donde se reproducen. Desde el punto de vista de su constitución genética existen dos tipos de virus: 1) aquellos cuyo cromosoma es una molécula de ARN (como el *virus del mosaico del tabaco*), y 2) aquellos en que el cromosoma es una molécula de ADN (como los virus bacterianos o *bacteriófagos*). Los virus utilizan su propio programa genético para reproducirse, pero dependen de la maquinaria biosintética de la célula huésped (es decir, ribosomas, ARN de transferencia, enzimas, etc.) para producir las proteínas que necesitan, como las capsides de sus cubiertas.

El tamaño de los virus varía entre 30 y 300 nm, y su estructura muestra diferentes grados de complejidad. Los virus son producidos en la célula huésped por un proceso de agregación macromolecular, lo cual significa que sus componentes son sintetizados separadamente en diferentes lugares de esa célula y luego reunidos de manera coordinada en otra parte de aquélla.

En la figura 1-4 se muestran adenovirus, que tienden a formar agregados de cristales dentro del núcleo de la célula infectada. Este virus contiene una molécula de ADN lineal de doble cadena, y los capsómeros son 240 hexonas y 12 pentonas situadas en el vértice del icosaedro.

Los *bacteriófagos* son virus que usan como huéspedes a células bacterianas. El ADN se halla comprimido dentro de la cabeza del fago y es inyectado

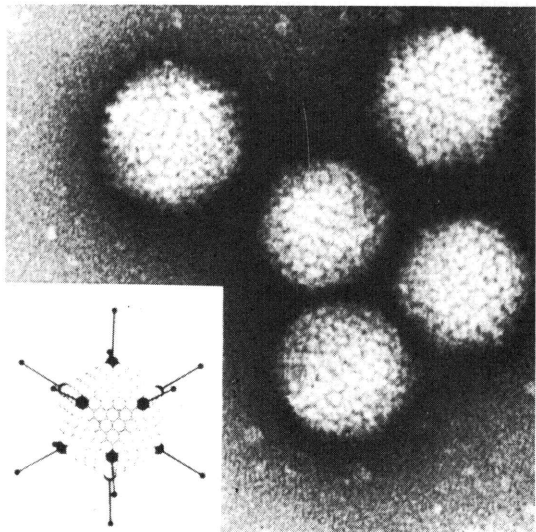


Fig. 1-4. Micrografía electrónica de adenovirus coloreados negativamente. El dibujo del recuadro muestra la estructura icosaédrica del virus y las pentonas (en negro) y hexonas de los capsómeros.

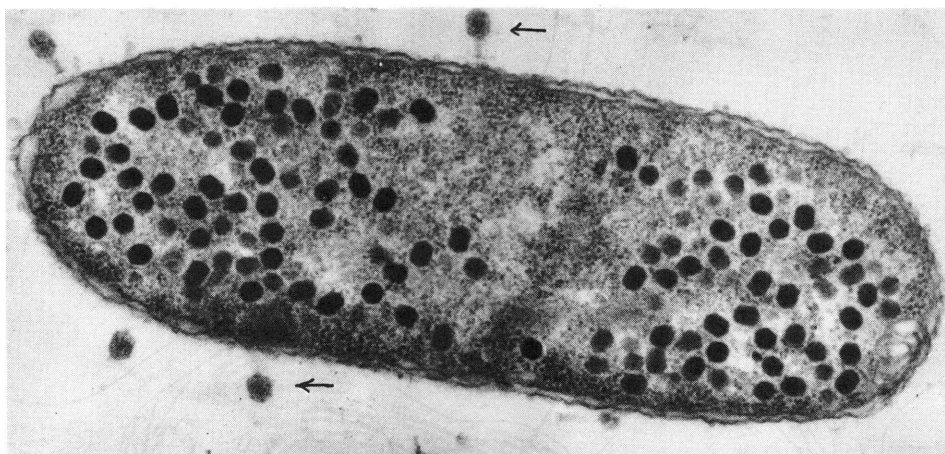


FIG. 1-5. *Escherichia coli* infectada por el bacteriófago T4 (compárese con la figura 1-3 de control). Se observan algunos fantasmas del fago adheridos a la pared celular (flechas), luego del ingreso del ADN. El nucleóide no se ve y la célula aparece llena de partículas del fago. (Cortesía de B. Menge, M. Wurtz y E. Kellenberger.)

en la bacteria por medio de una cola que se adhiere a la pared de la célula huésped y actúa como una especie de jeringa. Los fenómenos intracelulares que se suceden son muy rápidos y comienzan con la rotura del nucleóide y la hidrólisis enzimática del ADN de la célula huésped. Los nucleótidos resultantes son utilizados para sintetizar el ADN del fago. Luego son sintetizados el ARN y las proteínas estructurales del virus, y se necesitan unos 7 minutos para empaquetar y armar los fagos maduros dentro de la bacteria. Como se ilustra en la figura 1-5, después de 30 minutos la *Escherichia coli* está llena de virus y pronta a romperse para dejar a los bacteriófagos en libertad.

En células eucariotas infectadas el proceso es más complejo. Por ejemplo, el ADN de los adenovirus se replica en el núcleo de la célula huésped, las proteínas virales se sintetizan en ribosomas citosólicos y luego las distintas partículas virales se combinan entre sí en el interior de la célula. Un tipo especial es el representado por los virus tumorales, en los que la maduración se produce por gemación a partir de la membrana celular. El virus completo contiene una nucleocápside que está cubierta por una envoltura derivada de la membrana de la célula huésped en la cual se han insertado glicoproteínas virales.

Los *viroides* son organismos más simples que los virus. Son agentes infecciosos que atacan a células

vegetales y están formados por una sola molécula de ARN; no poseen la cubierta proteica o cápside. En la figura 1-6 se ilustra un viroide que produce una enfermedad en la papa. Su molécula de ARN circular contiene 359 nucleótidos, y puede multiplicarse e infectar a otros vegetales.

Para concluir esta sección dedicada a los virus, comparémoslos con las células verdaderas. Hemos dicho que las células poseen: 1) un programa genético específico que permite la formación de nuevas células similares a las predecesoras; 2) una membrana celular que establece un límite que regula los intercambios entre el interior y el exterior de la célula; 3) una maquinaria biológica que utiliza energía atrapada por la célula u obtenida de los alimentos; y 4) una maquinaria para sintetizar proteínas. Los virus poseen sólo la primera de estas facultades y carecen de las demás. Por este motivo no son considerados como células verdaderas, a pesar de contener los patrones genéticos sobre los cuales se forman los nuevos virus.

1-10. Organización general de las células eucariotas

Una vez estudiada la organización de las células procariotas, es conveniente volver a observar la tabla 1-4, en la que están resumidos los principales puntos de comparación con las células eucariotas.



FIG. 1-6. Secuencia de nucleótidos y estructura secundaria del viroide de la enfermedad de la papa. El ARN es circular, contiene sólo 359 nucleótidos y carece de codones AUG (señal para el comienzo de la síntesis proteica). Los viroides son los organismos infecciosos más simples que existen y no poseen cubierta proteica. (De J. J. Gross y col., 1978.)

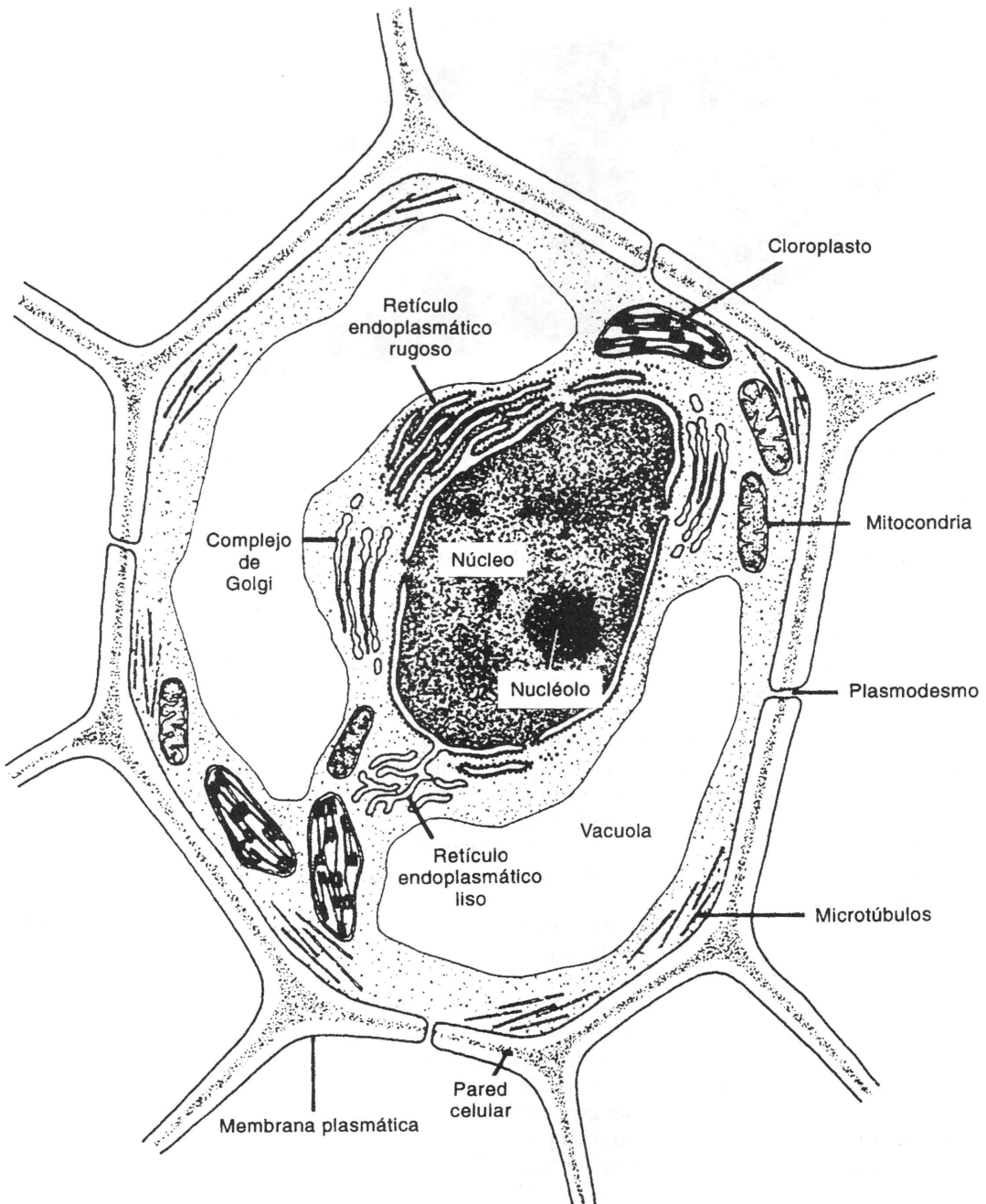


FIG. 1-7. Esquema de la ultraestructura de una célula vegetal idealizada que muestra sus principales componentes.

Si se compara la organización de la *Escherichia coli* (fig. 1-3) con la de una célula vegetal (fig. 1-7) o una célula animal (fig. 1-8), llama la atención la relativa complejidad de los eucariotas. En la célula eucariota en interfase, el *núcleo* constituye un compartimiento separado, limitado por la envoltura nuclear. Otro compartimiento —más grande— está representado por el *citoplasma*, el cual se halla

rodeado por la membrana plasmática, que muchas veces muestra diferenciaciones. Cada uno de estos tres componentes principales contiene a su vez varios subcomponentes o subcompartimientos. Podemos utilizar la tabla 1-5 como guía de esta compleja organización, dado que en ella se enumeran las principales características de una célula eucariota y se indican las funciones más importantes de cada

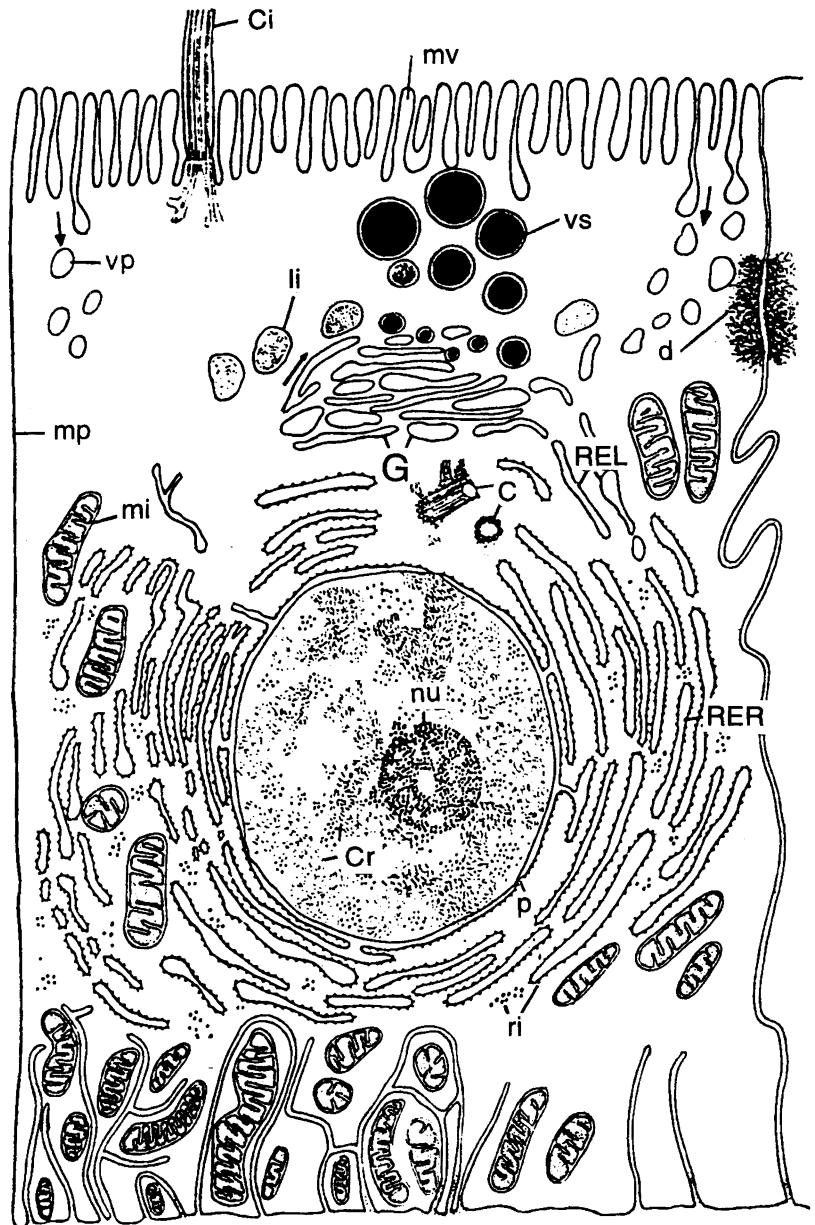


FIG. 1-8. Esquema general de la ultraestructura de una célula animal idealizada con sus principales componentes: retículo endoplasmático rugoso (RER); retículo endoplasmático liso (REL); membrana plasmática (mp); cromatina (cr); nucléolo (nu); poro de la envoltura nuclear (p); ribosomas (ri); mitocondria (mi); lisosoma (li); vesícula secretoria (vs); centríolo (c); complejo de Golgi (G); desmosoma (d); cilio (ci); microvellosidad (mv); vesícula de pinocitosis (vp).

componente. Cuando estudiemos cada uno de estos componentes por separado, se verá que en la tabla se han simplificado los datos al máximo.

1-11. Existe una gran diversidad morfológica entre las células eucariotas

Las células de un organismo multicelular tienen forma y estructura variables y se diferencian de acuerdo con la función específica de los distintos tejidos y órganos. Esta especialización funcional hace que las células adquieran características singulares, aun cuando en todas ellas persiste un modelo de organización común (fig. 1-9).

Algunas células, como las amebas y los leucocitos, cambian de forma frecuentemente. Otras, como las células nerviosas y la mayoría de las células vegetales, poseen una forma típica que es más o menos fija y específica para cada tipo celular. La forma de una célula depende de sus adaptaciones funcionales, del citoesqueleto presente en su citoplasma, de la acción mecánica ejercida por las células adyacentes y de la rigidez de la membrana plasmática.

El tamaño de las células oscila dentro de límites amplios. Algunas células vegetales y animales pueden observarse a simple vista. Sin embargo, la mayoría de las células son visibles sólo con el micros-

TABLA 1-5. Organización general de la célula eucariota

Principales componentes	Subcomponentes	Función principal
Membrana celular	Pared celular Cubierta celular Membrana plasmática	Protección Interacciones celulares Permeabilidad, endocitosis y exocitosis
Núcleo	Cromosomas Nucléolo	Genes Síntesis de ribosomas
Citoplasma		
Citosol	Enzimas solubles Ribosomas	Glucólisis Síntesis proteica
Citoesqueleto	Microtúbulos Microfilamentos	Forma y movilidad de la célula
Organoides microtubulares	Centrosoma y centríolos Cuerpos basales y cilios	División celular Motilidad celular
Sistema de endomembranas	Membrana nuclear Retículo endoplasmático Complejo de Golgi Endosomas y lisosomas	Permeabilidad nuclear Síntesis y procesamiento Secreción Digestión
Organoides de membrana	Mitocondrias Cloroplastos Peroxisomas	Síntesis de ATP Fotosíntesis Protección

copio, puesto que tienen unos pocos micrómetros de diámetro (fig. 1-1).

En general, el volumen de la célula es bastante constante para un determinado tipo celular y es independiente del tamaño del organismo. Por ejemplo, las células del riñón o del hígado tienen casi el mismo tamaño en el elefante, el caballo y el ratón. La diferencia de la masa total del órgano depende de la cantidad de células y no del volumen éstas.

1-12. La membrana plasmática separa el contenido de la célula del medio externo

La estructura que separa el contenido de la célula del medio externo es la *membrana plasmática*. Se trata de una delgada película de 5 nm de espesor, compuesta por una bicapa lipídica continua con proteínas intercaladas o adheridas a su superficie. La membrana plasmática sólo puede verse con el microscopio electrónico, que revela sus numerosas *diferenciaciones* y los distintos *tipos de uniones* que la conectan con las membranas de las células adyacentes (fig. 1-8). Una de las funciones de la membrana plasmática es la de controlar de manera selectiva el pasaje de solutos. Ello incluye el ingreso de agua y moléculas de gran tamaño por el proceso de *endocitosis* y la salida de productos celulares por *exocitosis* (tabla 1-5). En las células vegetales la membrana plasmática está cubierta y reforzada por la *pared celular*, y en las células animales suele estarlo por la llamada *cubierta celular*.

La pared celular es la estructura a la que deben su rigidez la mayoría de los tejidos vegetales. Está formada principalmente por fibras celulósicas, en las que pueden hallarse otras sustancias, como la lignina, el principal componente de la madera. Como se ilustra en la figura 1-7, existen túneles que atraviesan la pared celular —denominados *plasmodesmos*—, que posibilitan la comunicación entre las células de los tejidos vegetales.

En la mayor parte de las células animales la membrana plasmática se halla rodeada por una cubierta celular —formada por polisacáridos, glicoproteínas y glicolípidos— que suele tener mayor espesor que la misma membrana. Esta cubierta, además de proteger a la célula, es fundamental para la asociación de las células en los tejidos.

1-13. La presencia del núcleo caracteriza a la célula eucariota

A veces, la forma del núcleo se relaciona con la de la célula, aunque puede ser por completo irregular. En las células esféricas, cúbicas o poliédricas, el núcleo generalmente es esférico, y en las células cilíndricas o fusiformes suele ser elipsoidal.

El tamaño del núcleo es proporcional al número de cromosomas. En los ovocitos, el núcleo se halla muy activo y puede alcanzar gran volumen. Los núcleos en las células somáticas tienen tamaños específicos, que dependen del contenido de ADN y proteínas y, principalmente, de su actividad funcional durante la interfase.

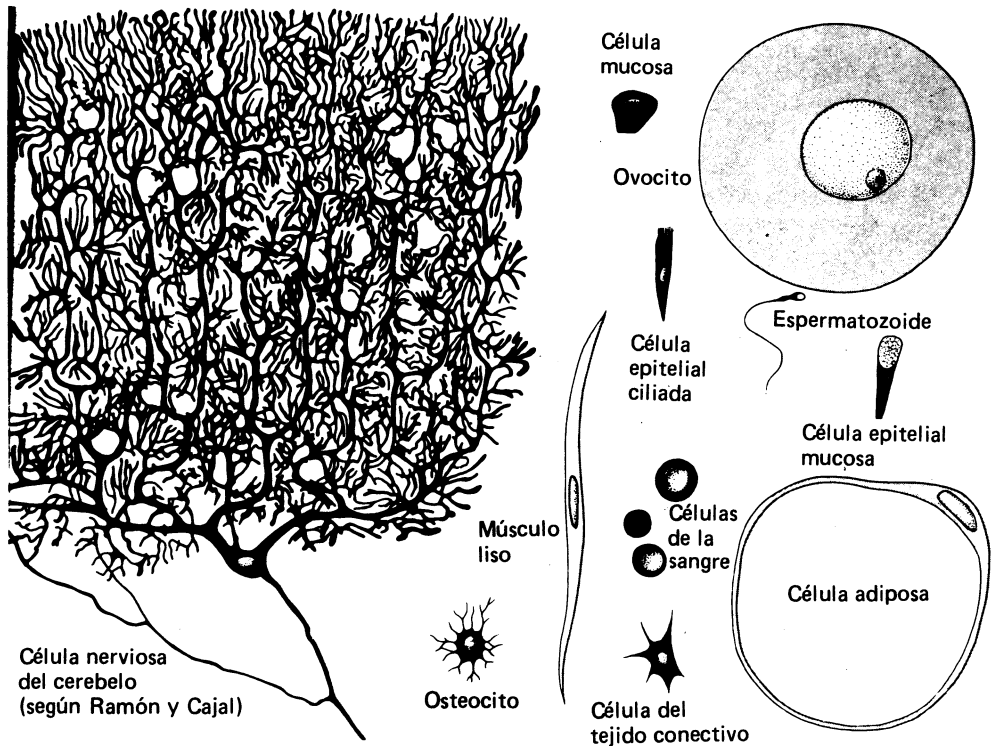


FIG. 1-9. Algunos de los tipos celulares que se encuentran en los tejidos animales. Obsérvense las diferencias de formas y tamaños.

Casi todas las células son mononucleadas, pero existen algunas binucleadas (células hepáticas y cartilaginosas) y otras polinucleadas. En los *plasmodios* —que constituyen grandes masas protoplasmáticas no divididas en territorios celulares— los núcleos pueden ser extraordinariamente numerosos. Tal es el caso de las fibras musculares estriadas, que pueden contener varios centenares de núcleos.

El crecimiento y desarrollo de los organismos vivos dependen del crecimiento y la multiplicación de sus células. En los organismos unicelulares, la división celular implica una verdadera reproducción; por este proceso, a partir de una célula se originan dos células hijas. Por el contrario, los organismos multicelulares derivan de una sola célula —el cigoto—, y la repetida multiplicación de ésta y de sus descendientes determina el desarrollo y el crecimiento del individuo.

La célula crece hasta cierto límite antes que se produzca su división. Este proceso se repite nuevamente en las dos células hijas, de modo que el volumen total será en definitiva de cuatro veces el de la célula original. El crecimiento de la célula viviente se produce rítmicamente y de acuerdo con una progresión geométrica, expresable en la siguiente forma:

$$\frac{Mn}{Mc} ; \frac{2 Mn}{2 Mc} ; \frac{4 Mn}{4 Mc} ; \frac{8 Mn}{8 Mc} ; \text{etc.},$$

donde Mn representa la masa nuclear y Mc la masa citoplasmática de la célula. Entre ambas existe un equilibrio óptimo, la denominada relación o *índice nucleocitoplasmático*, que se expresa así:

$$NP = \frac{Vn}{Vc - Vn},$$

donde Vn es el volumen nuclear y Vc el volumen celular.

En general, todas las células pasan por dos períodos en el curso de su vida: uno de *interfase* (no división) y otro de *división* (en el cual se producen dos células hijas). Este ciclo se repite en cada generación celular, pero el tiempo varía considerablemente de un tipo celular a otro. La función esencial del núcleo es almacenar y proporcionar a la célula la información que se encuentra en la molécula de ADN. Esta molécula se duplica durante un período especial de la interfase que se denomina *fase S* (o *fase sintética*), en preparación para la división celular (fig. 14-2). Durante la interfase la información genética es también transcrita en diferentes moléculas de ARN (*mensajero*, *ribosómico* y *de transferencia*) que, después de pasar al citoplasma, tradu-

cen la información genética para la síntesis de proteínas específicas. De tal modo, los papeles esenciales del núcleo son: 1) el almacenamiento de la información genética; 2) la duplicación del ADN; y 3) la transcripción del ADN.

En el material fijado y coloreado, la estructura del núcleo se caracteriza por su complejidad. En general se reconocen las siguientes estructuras en el núcleo interfásico (fig. 1-8): 1) Una *envoltura nuclear*, compuesta por dos membranas y perforada cada tanto por *poros nucleares*. 2) La *matriz nuclear* (o *nucleoplasma*), que ocupa gran parte del espacio nuclear. 3) Las fibras de cromatina —compuestas por ADN y proteínas—, que son los *cromosomas* más o menos desenrollados. Estas fibras exhiben regiones de *eucromatina* (del griego *eu*, verdadero), donde se encuentran más desenrolladas, y regiones de *heterocromatina*, que representan las partes de los cromosomas que permanecen condensadas durante la interfase. Las regiones heterocromáticas se hallan frecuentemente cerca de la envoltura nuclear y asociadas al nucléolo. 4) El *núcleolo*, por lo general esférico, es más grande en células con una síntesis proteica muy activa. El nucléolo puede ser único o múltiple, y su papel es el de sintetizar las moléculas de ARN ribosómico, asociándolas luego a numerosas proteínas para formar los ribosomas antes de que éstos pasen al citoplasma.

Durante la división celular el núcleo experimenta una serie de cambios complejos —notablemente regulares y constantes—, durante los cuales desaparecen la envoltura nuclear y el nucléolo, y la cromatina se condensa formando cuerpos que se colorean intensamente, los *cromosomas* (del griego *chroma*, color y *soma*, cuerpo). Vimos que los cromosomas no pueden ser individualizados en el núcleo interfásico debido a que en esa etapa del ciclo celular la fibra de cromatina se halla bastante desenrollada.

La molécula de ADN está asociada con proteínas básicas —llamadas *histonas*— con las cuales forma estructuras granulares de unos 10 nm, denominadas *nucleosomas*. Las hileras de nucleosomas constituyen las fibras de cromatina más delgadas (fig. 10-8). Antes de la división celular, las fibras de cromatina se pliegan cada vez más, y entonces se las puede observar con el microscopio óptico bajo la forma de cromosomas (fig. 10-13).

1-14. Conceptos básicos sobre mitosis y meiosis

Es importante introducir en este momento lo esencial en lo referente a la mitosis y la meiosis, que se estudiarán con mayores detalles en los ca-

pítulos 15 y 16. Hemos dicho que todos los organismos que se reproducen sexualmente se desarrollan a partir de una célula única —el cigoto—, que resulta de la unión de un ovocito con un espermatozoide durante la fecundación. Excepto los gametos, cada célula del individuo contiene un número idéntico de cromosomas. En las células somáticas los cromosomas se presentan de a pares. Un miembro de cada par proviene de uno de los progenitores, y el otro miembro es aportado por el otro progenitor.

Los miembros de un par de cromosomas se denominan *homólogos*, y se habla comúnmente de pares de cromosomas o de pares de homólogos para hacer referencia al número de cromosomas de una especie. El hombre posee 46 cromosomas o 23 pares de ellos. Los homólogos de cada par son semejantes, pero los pares son diferentes entre sí. El número original de cromosomas de cada célula (*número diploide*) se conserva durante las sucesivas divisiones celulares que tienen lugar en el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de los organismos multicelulares.

1-15. La mitosis mantiene la continuidad y el número diploide de los cromosomas

La continuidad del número cromosómico es mantenida por medio de una clase especial de división celular, denominada *mitosis*. Cuando se produce la división celular, el núcleo experimenta una reorganización completa, hecho que se ilustra en la figura 1-10. La mitosis comprende una serie consecutiva de fases, conocidas como *profase*, *prometáfase*, *metáfase*, *anafase* y *telófase*. En las células somáticas los núcleos se dividen por mitosis y de ello resultan núcleos hijos con el mismo número de cromosomas. Por consiguiente, las células hijas son, en cuanto a su constitución cromosómica, idénticas entre sí y a sus antecesoras.

En la figura 1-10 se representan dos pares de cromosomas homólogos en una célula diploide. Los cromosomas se duplican individualmente durante la interfase (fase S). En esta etapa y en la profase temprana, los cromosomas aparecen como filamentos extendidos y delgados. Al final de la profase se convierten en bastones cortos y compactos, por el empaquetamiento de la cromatina. En la metafase los cromosomas se colocan en un solo plano, en la región ecuatorial de la célula. En esta etapa pueden visualizarse los dos filamentos de cromatina que poseen los cromosomas, llamados *cromátidas*. En la anafase, ambas cromátidas se separan y cada cromátida hija —es decir, cada cromosoma hijo— se dirige al polo celular correspondiente. Finalmente, en la telófase se forman sendos núcleos a partir

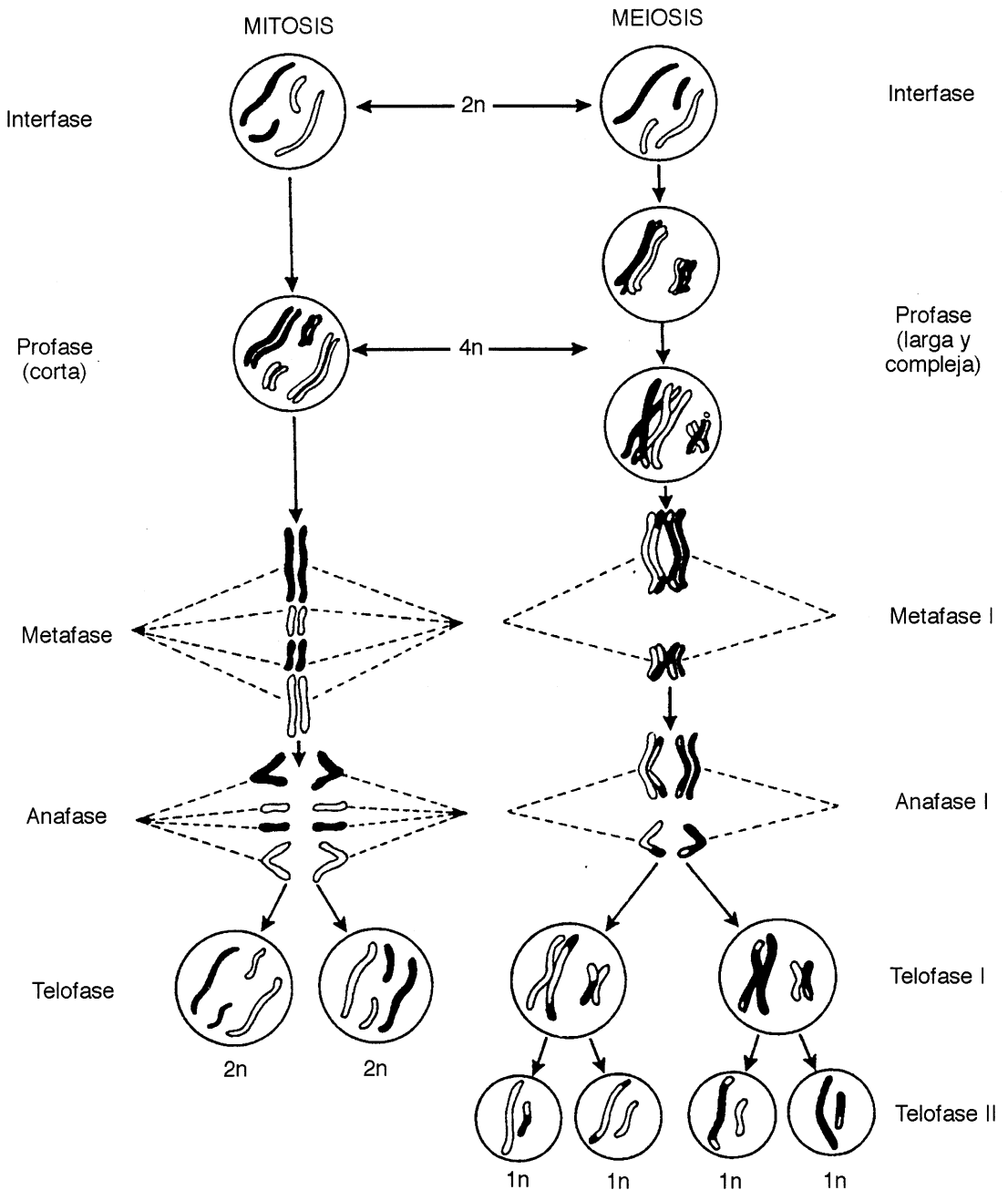


FIG. 1-10. Esquema comparativo de la mitosis y la meiosis de una célula con cuatro cromosomas ($2n$). Los cromosomas pertenecientes a cada progenitor están representados en blanco y en negro, respectivamente. En la mitosis, la división es ecuacional, mientras que en la meiosis es reduccional. Las dos divisiones de la meiosis dan lugar a cuatro células que tienen solo dos cromosomas (n). Además, puede observarse que durante la meiosis se produce un intercambio de segmentos entre los cromosomas.

de cada uno de los dos grupos de cromosomas hijos.

En la mitosis se mantiene el número de cromosomas original durante las divisiones nucleares su-

cesivas. Puesto que las células somáticas derivan del cigoto, todas ellas contienen un juego doble —o sea, un número diploide ($2n$)— de cromosomas.

1-16. La meiosis reduce los cromosomas a un número haploide

Si los gametos (óvulo y espermatozoide) fueran diploides, el cigoto resultante tendría el doble del número diploide de cromosomas. Para evitarlo, los gametos experimentan un tipo especial de división celular —denominada *meiosis*—, en la cual el número diploide normal se reduce a un juego único o *haploide* (n) en cada gameto. El cigoto será así nuevamente diploide. El proceso meiótico es característico de todos los vegetales y animales que se reproducen sexualmente, y tiene lugar en el curso de la gametogénesis (fig. 1-10). La meiosis produce la reducción del número de cromosomas mediante *dos divisiones nucleares* sucesivas —la primera y la segunda división meiótica—, acompañadas por *una única duplicación de los cromosomas*.

La esencia del proceso es simple: los cromosomas homólogos se aparean y forman una *tétrada* o *bivalente*. Cada cromosoma se compone de dos cromátidas y, por tanto, el bivalente posee cuatro cromátidas. De un homólogo a otro suelen intercambiarse porciones de las cromátidas apareadas, lo cual da lugar a figuras de entrecruzamientos que se denominan *quiasmas*. Cada quiasma es la manifestación citológica de un fenómeno llamado *recombinación genética* o *crossing-over*.

En la metafase I los bivalentes se disponen en el ecuador celular, y en la anafase I cada cromosoma homólogo, con sus dos cromátidas asociadas, va hacia los polos opuestos. Después de un corto período de interfase, las dos cromátidas de cada homólogo se separan en la segunda división meiótica, de modo que las cuatro cromátidas quedan distribuidas en cada uno de los cuatro gametos resultantes. Como consecuencia, los núcleos de estos últimos contienen cada uno un número simple —haploide— de cromosomas (fig. 1-10).

1-17. El citoplasma contiene una matriz denominada citosol

El compartimiento citoplasmático presenta una organización estructural muy compleja. Su estudio con el microscopio electrónico revela una asombrosa red de membranas. Este sistema de endomembranas ocupa gran parte del citoplasma —dividiéndolo en numerosas secciones y subsecciones— y es tan polimorfo que resulta difícil definirlo y describirlo. En general se considera que el citoplasma se divide en dos compartimientos: uno contenido dentro del *sistema de endomembranas* y otro —la matriz citoplasmática o *citosol*— que queda fuera de éstas.

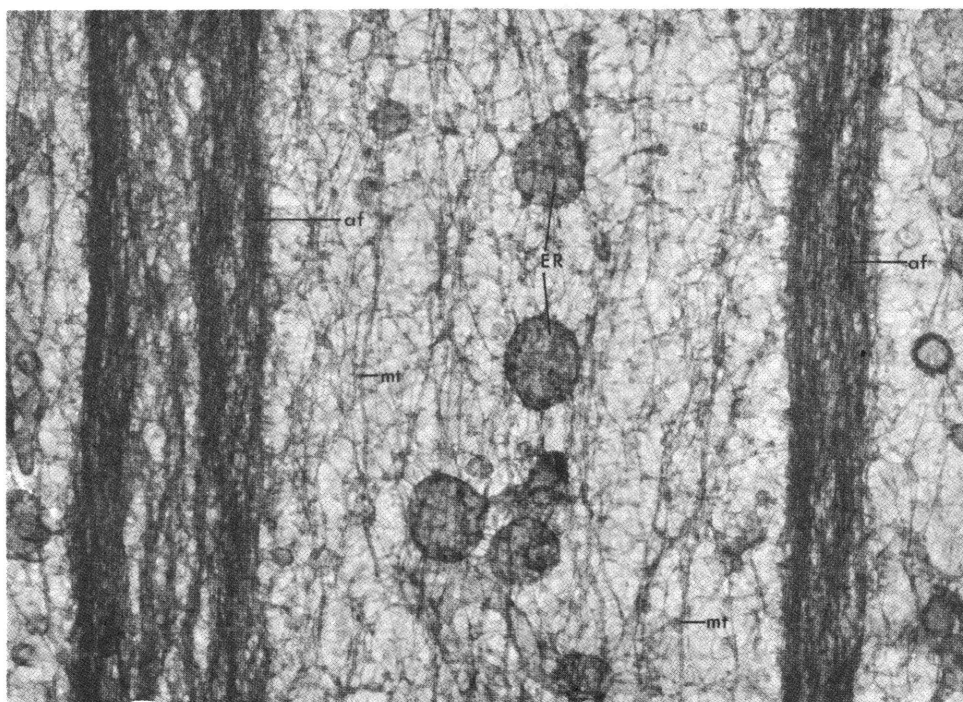


FIG. 1-11. Micrografía electrónica de una célula cultivada. Se observan dos haces de filamentos de actina (af) y un gran número de microtúbulos (mt). También aparecen vesículas del retículo endoplasmático (ER). (Cortesía de K. R. Porter.)

Los componentes más importantes del citoplasma están en el citosol, es decir, por fuera del sistema de endomembranas. El citosol constituye el verdadero medio interno celular, contiene las principales estructuras vinculadas con la forma y el movimiento de la célula, y en él tienen lugar la síntesis proteica y diversas actividades metabólicas.

1-18. El citoesqueleto está compuesto por varios tipos de filamentos

Varios tipos de *microfilamentos* que se encuentran en el citosol constituyen una especie de *citoesqueleto* dinámico que sirve de almacén para diversas funciones de la célula. Así, este citoesqueleto interviene en el mantenimiento de la forma celular, en la motilidad celular, en los cambios coloidales que experimenta el citoplasma, etcétera.

Los *microtúbulos* son estructuras tubulares finas y más bien rígidas (fig. 1-11), de unos 25 nm de diámetro, cuyas paredes están compuestas por 13 filamentos individuales. La principal proteína de los microtúbulos es la *tubulina*. Los microtúbulos pueden alargarse y acortarse rápidamente por un proceso de polimerización y despolimerización de las unidades de tubulina. De esa manera generan cambios en la forma celular, lo mismo que el desplazamiento de macromoléculas y orgánoides por el citoplasma. Además, componen estructuras dinámicas relacionadas con la división celular —como las fibras del *huso mitótico*— y estructuras más complejas, por ejemplo, los centríolos, los cuerpos basales y los cilios.

Los *centríolos* son estructuras cilíndricas que miden aproximadamente $0,2 \times 0,4 \mu\text{m}$; están abiertos en ambos extremos y sus paredes contienen nueve grupos de tripletes de microtúbulos dispuestos en círculo. Generalmente los centríolos son dobles y sus dos unidades están dispuestas en ángulo recto entre sí. Durante la mitosis, los centríolos emigran hacia los polos de las células, pero no intervienen en la formación de las fibras del huso mitótico (las células vegetales carecen de centríolos y el huso igual se forma). Estas fibras nacen en los centrosomas, que son estructuras vinculadas con los centríolos.

Los *cuerpos basales* son similares a los centríolos, pero se encuentran localizados en la base de los cilios y los flagelos. Los *cilios* son prolongaciones cortas (3 a $10 \mu\text{m}$) que nacen en la superficie celular y se extienden hacia el medio circundante. Los flagelos son más largos que los cilios, aunque tienen el mismo diámetro ($0,5 \mu\text{m}$) e igual estructura. El eje de ambos —llamado *axonema*— está rodeado por la membrana plasmática y tiene una estructura semejante a la de los centríolos, formada por nueve dobletes de microtúbulos dispuestos en

círculo, más dos microtúbulos simples en el centro. Esta organización $9 + 2$ difiere de la de los centríolos y cuerpos basales, los cuales poseen nueve tripletes en círculo, y ninguno en la región central. Los cilios son utilizados para la locomoción de células aisladas, por ejemplo, los espermatozoides, ciertos protozoos, etc., o para movilizar a otras células o a partículas, como ocurre en el oviducto (donde empujan al ovocito o al cigoto) y en las vías aéreas.

Los *filamentos de actina* se encuentran entre las estructuras más pequeñas observadas con el microscopio electrónico, ya que miden 8 nm de diámetro (fig. 1-11). Dentro de sus funciones más importantes se halla la de darle forma y motilidad a las células; también intervienen en la división celular, durante la citocinesis.

El citoesqueleto contiene asimismo *filamentos de tamaño intermedio* (10 nm) entre el de los microtúbulos y el de los filamentos de actina. Se hallan formados por diversas proteínas fibrosas y tienen un papel principalmente mecánico.

1-19. El sistema de endomembranas contiene la envoltura nuclear, el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi, los endosomas y los lisosomas

La figura 1-8 ilustra la continuidad y las interconexiones funcionales existentes entre los distintos componentes del *sistema de endomembranas* citoplasmático.

La *envoltura nuclear* está compuesta por dos membranas. Estas se unen en los *poros nucleares*, que son orificios que permiten el pasaje de materiales entre el núcleo y el citosol. La membrana interna se halla en contacto con los cromosomas, mientras que la membrana externa suele estar cubierta por ribosomas.

El *retículo endoplasmático* constituye la mayor parte del sistema de endomembranas (fig. 1-12). Está compuesto por sacos aplanados y túbulos. La superficie externa del retículo endoplasmático *rugoso* se halla cubierta por ribosomas, los cuales sintetizan proteínas hacia la luz o cavidad del retículo. El retículo endoplasmático *liso* se continúa con el rugoso e interviene en la síntesis de diversas moléculas.

El *complejo de Golgi* representa una parte diferenciada del sistema de endomembranas. Está formado por pilas de sacos aplanados y vesículas (fig. 1-12). Este complejo interviene en el procesamiento y empaquetamiento de los productos provenientes del retículo endoplasmático, los cuales, por intermedio de vesículas especiales, son liberados de la célula por *exocitosis* o incorporados a los endosomas.

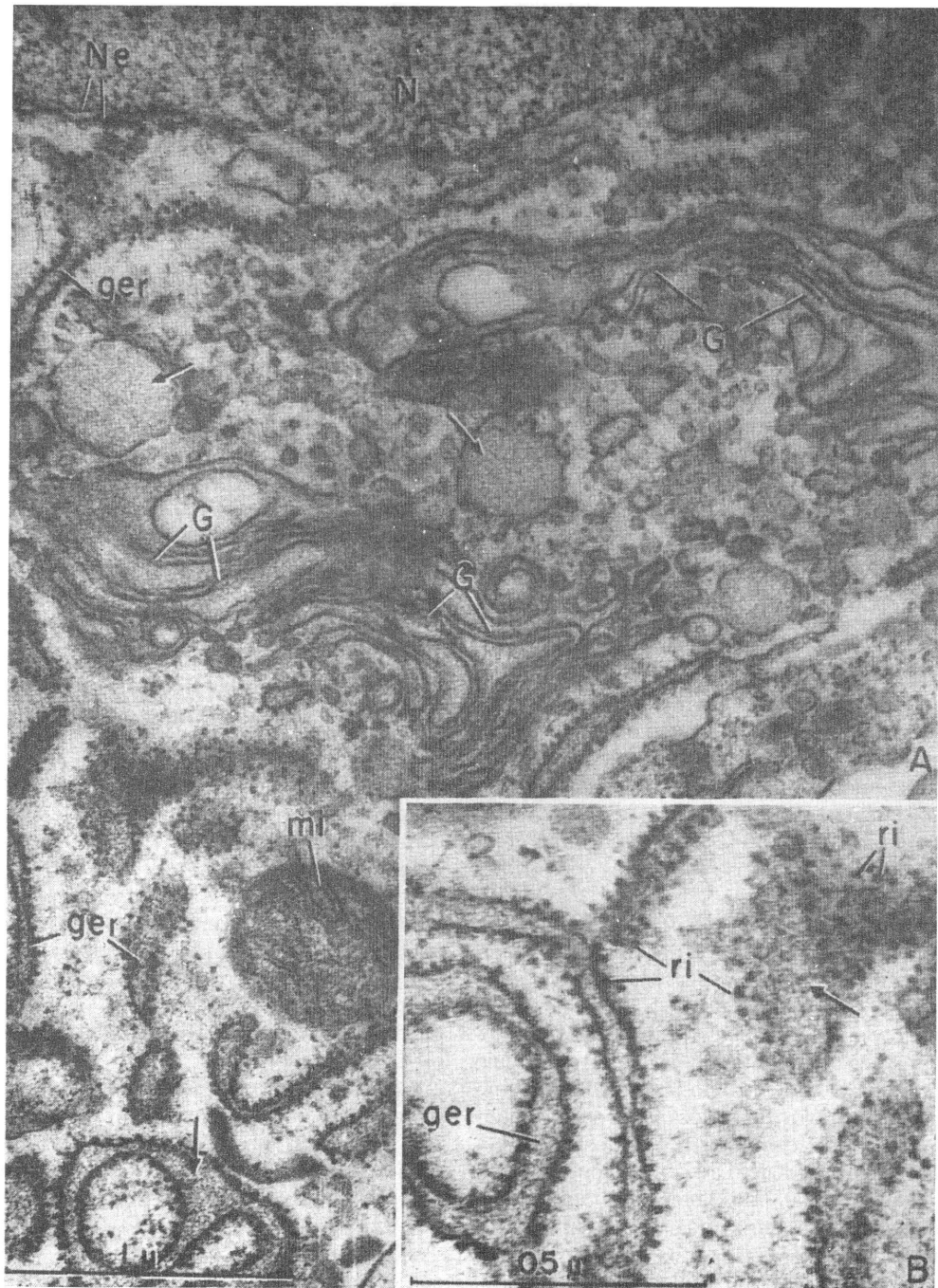


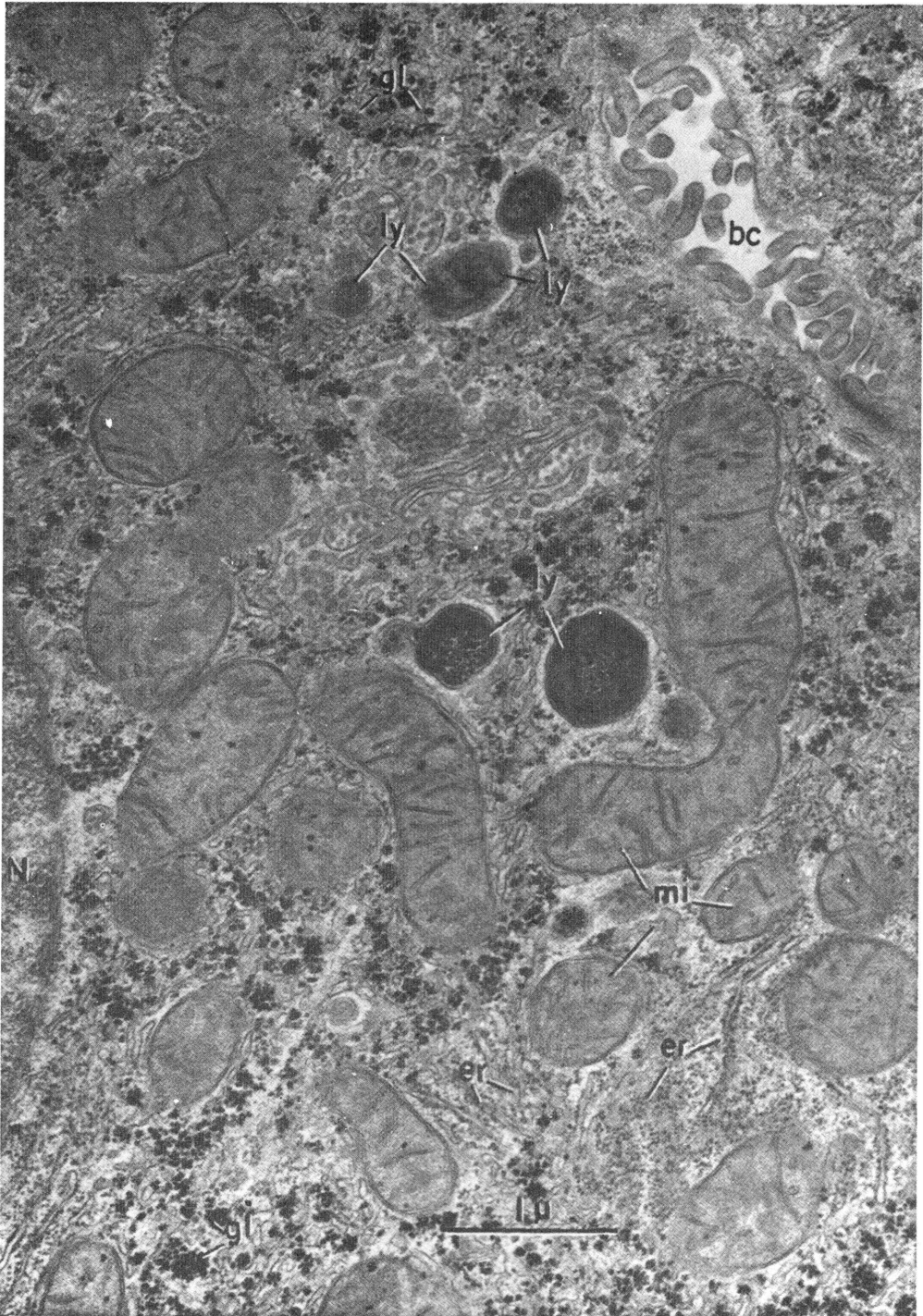
FIG. 1-12. Micrografía electrónica de una célula plasmática. Cerca del núcleo (N) se observa el complejo de Golgi (G) constituido por pequeñas cisternas aplanadas y vesículas. Algunas de las vesículas se encuentran llenas de material (flechas). Rodeando al complejo de Golgi existe un abundante retículo endoplasmático rugoso (ger) con cisternas llenas de material amorfo (flechas). ri, ribosomas; mi, mitocondrias; N, núcleo; Ne, envoltura nuclear. 48.000×. Recuadro, 100.000×. (De E. De Robertis y A. Pellegrino de Iraldi.)

FIG. 1-13. Región periférica de una célula hepática en la que se observan un capilar biliar (bc), lisosomas (ly), el núcleo (N), mitocondrias (mi), el retículo endoplasmático (er) e inclusiones de glucógeno (gl). 31.000×. (Cortesía de K. R. Porter.)

Los *endosomas* son los organoides encargados de recibir el material que ingresa a la célula por *endocitosis*; se convierten en lisosomas una vez que incorporan ciertas enzimas hidrolíticas provenientes del complejo de Golgi.

Los *lisosomas* son organoides polimorfos, rodea-

dos por una membrana (fig. 1-13). Contienen en su interior una amplia gama de enzimas hidrolíticas responsables de la digestión de las sustancias que son incorporadas a la célula por endocitosis; también degradan a las partes obsoletas del citoplasma (autofagia).



1-20. Las mitocondrias, los plástidos y los peroxisomas son orgánoides fundamentales para el funcionamiento celular

Las *mitocondrias* se encuentran prácticamente en todas las células eucariotas. Son estructuras cilíndricas de alrededor de 3 μm de largo por 0,5 μm de diámetro, que poseen dos membranas. La membrana interna se halla plegada formando crestas que invaden parcialmente a la matriz mitocondrial (fig. 1-13). Tanto la membrana interna como la matriz mitocondrial contienen numerosas enzimas que intervienen en la extracción de la energía de los alimentos.

Las células vegetales contienen orgánoides denominados *plástidos*, los cuales se hallan ausentes en las células animales. Algunos de ellos, como los *leucoplastos*, son incoloros y participan principalmente en el almacenamiento del almidón. Otros contienen pigmentos y, en conjunto, se denominan *cromoplastos*. Entre los más importantes se encuentran los *cloroplastos*, con un pigmento verde llamado clorofila (fig. 1-7). El cloroplasto posee dos membranas, una estroma con enzimas solubles y un compartimiento singular formado por sacos aplanados, llamados *tilacoides*. En los cloroplastos tiene lugar la fotosíntesis, proceso por el cual las plantas captan la energía de la luz y, utilizando H_2O y CO_2 , sintetizan diversos compuestos que usan o no como alimento.

Tanto las mitocondrias como los cloroplastos poseen un sistema genético propio —con sus ADN, ARNm, ribosomas y ARNt—, por lo que pueden sintetizar algunas de sus proteínas.

Los *peroxisomas* están rodeados por una sola membrana. Contienen enzimas relacionadas con la producción y degradación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y una de sus funciones es proteger a la célula.

BIBLIOGRAFIA

- Bauneister W. (1978) Biological horizons in molecular microscopy. *Cytobiologie* 17:246.
- Bernal J. D. and Synge A. (1973) The origin of life. In: *Readings in Genetics and Evolution*. Oxford University Press, London.
- Beveridge T. J. (1981) Ultrastructure, chemistry and function of bacterial wall. *Int. Rev. Cytol.* 72:299.
- Claude A. (1975) The coming of age of the cell. *Science* 189: 433.
- Darnell J. E., Lodish H. F. and Baltimore D. (1990) *Molecular Cell Biology*, 2nd Ed. Scientific American Books, New York.
- De Robertis E. D. P. and De Robertis E. M. F. (1981) *Essentials of Cell and Molecular Biology*. Saunders, Philadelphia.
- Diener T. O. (1981) Viroids. *Sci. Am.* 244:66.
- Giese A. C. (1979) *Cell Physiology*, 5th Ed. Saunders, Philadelphia.
- Gray M. W. (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.* 5:294.
- Hayflick L. (1980) The cell biology of human aging. *Sci. Am.* 242:58.
- Hess E. L. (1970) Origins of molecular biology. *Science* 168: 664.
- Jacob F. (1977) Evolution and tinkering. *Science* 196:1161.
- Johnson J. E. (1982) *Aging and Cell Structure*, Vol. 1. Academic Press, New York.
- Joyce G. F. (1992) Directed molecular evolution. *Sci. Am.* 267:90.
- Margulis L. (1971) Symbiosis and evolution. *Sci. Am.* 225:48.
- Margulis L. and Schwartz K. V. (1982) *Five Kingdoms. An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*. W. H. Freeman, New York.
- Monod J. (1971) *Chance and Necessity*. Random House Inc., New York.
- Orgel L. E. (1992) Molecular replication, *Nature* 358:203.
- Schwartz R. and Dayhoff M. (1978) Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria and chloroplasts. *Science* 199: 395.
- Watson J. D. et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, 4th Ed. W. A. Benjamin-Cummings, Menlo Park, CA.
- Woese C. R. and Fox G. E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5088.

2 / Componentes químicos de la célula

Eduardo De Robertis y José Hib

INTRODUCCION

2-1. Los componentes químicos de la célula se clasifican en inorgánicos y orgánicos

La estructura de la célula es consecuencia de moléculas que se hallan organizadas en un orden muy preciso. Aun cuando queda mucho por aprender, ya se conocen los principios generales de la organización molecular de la mayoría de las estructuras celulares, como las membranas, los ribosomas, los cromosomas, las mitocondrias, los cloroplastos, etc., que se estudian en los capítulos respectivos. La biología de la célula es inseparable de la de las moléculas, porque de la misma manera que las células son los bloques con que se edifican los tejidos y los organismos, las moléculas son los bloques con que se construyen las células.

Al principio el estudio de la composición química de la célula se hizo por análisis bioquímico de órganos y tejidos enteros, como el hígado, el cerebro, la piel o el meristema vegetal. Estos estudios solo poseen un valor citológico relativo, porque el material analizado está compuesto generalmente por una mezcla de diferentes tipos celulares y contiene material extracelular. En los últimos años el desarrollo de métodos de fraccionamiento celular y de diversos micrométodos (cap. 3) permitió aislar diferentes elementos subcelulares, y recoger una información más importante y precisa sobre la estructura molecular de la célula.

Los componentes químicos de la célula se clasifican en *inorgánicos* (agua y minerales) y *orgánicos* (proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, lípidos, etc.).

Del total de los componentes de las células un 75 a 85% es *agua*, entre el 2 y el 3% son *sales*

inorgánicas, y el resto son compuestos orgánicos derivados de átomos de carbono, los cuales representan las moléculas de la vida. Numerosas estructuras celulares están formadas por moléculas muy grandes —denominadas macromoléculas o polímeros—, compuestas por unidades repetidas llamadas monómeros, que se enlazan por medio de uniones covalentes.

En los organismos vivos existen tres ejemplos importantes de polímeros: 1) los *ácidos nucleicos*, conformados por la repetición de cuatro unidades diferentes denominadas nucleótidos; la secuencia lineal de los cuatro nucleótidos en la molécula de ADN es la fuente primaria de la información genética; 2) los *polisacáridos*, que pueden ser polímeros de glucosa —con los cuales se forman almidón, celulosa o glucógeno—, o que pueden comprender la repetición de otros monosacáridos, con los que se forman polisacáridos más complejos; y 3) las *proteínas* (polipéptidos), que se hallan constituidas por 20 tipos de aminoácidos combinados en diferentes proporciones; el orden en que se encuentran unidos estos 20 monómeros da lugar a un extraordinario número de combinaciones, lo que determina no solo la especificidad sino también la actividad biológica de las diferentes moléculas proteicas.

Además de destacar las características estereoquímicas de los principales componentes químicos de la célula, en este capítulo abordaremos el estudio de las enzimas como instrumentos moleculares capaces de producir transformaciones químicas, y aprenderemos algunos mecanismos que regulan su actividad dentro de la célula. Este estudio se verá complementado con algunas nociones acerca de la manera en que las macromoléculas pueden agre-

garse y organizarse en estructuras supramoleculares más complejas, hasta resultar visibles con el microscopio electrónico. Tales agregaciones moleculares probablemente actuaron durante un período de evolución química y biológica que finalmente originó a la primera célula viviente. Por tal motivo, el presente capítulo terminará con algunas consideraciones especulativas acerca del posible origen de las células procariotas y eucariotas, es decir, con la aparición de la vida en nuestro planeta. Los conceptos vertidos en este capítulo solo sirven como una introducción elemental al conocimiento de la biología celular y molecular. El estudio más amplio de sus temas compete a los textos de bioquímica.

AGUA Y MINERALES

2-2. El agua es el componente de la célula que se encuentra en mayor cantidad

El *agua*, con unas pocas excepciones —por ejemplo, el hueso, el diente y las semillas— es el componente que se encuentra en las células en mayor cantidad. El contenido de agua de un organismo está en relación con la edad y con la actividad metabólica; es mayor en el embrión (90-95%) y disminuye con los años. El agua sirve como solvente natural de los iones minerales y otras sustancias, y también como medio de dispersión para la estructura coloidal de los componentes celulares. El agua es indispensable para la actividad metabólica, ya que los procesos fisiológicos se producen exclusivamente en medios acuosos. Las moléculas de agua también participan en muchas reacciones enzimáticas de la célula y pueden formarse como resultado de procesos metabólicos.

El contenido de agua de la célula está dado por la suma de una fracción libre y otra ligada. El *agua libre* representa el 95% del agua total y es la parte usada principalmente como solvente para los solutos y como medio dispersante del sistema coloidal que se da en la célula. El *agua ligada* representa solo el 5%, y es la que está unida laxamente a las proteínas por uniones de hidrógeno y otras fuerzas (sección 2-13). Comprende el agua inmovilizada en

el seno de las macromoléculas. Como resultado de la distribución asimétrica de sus cargas, una molécula de agua se comporta como un *dipolo*, según se advierte en la figura 2-1. A causa de esta propiedad, el agua puede adherirse electrostáticamente a las proteínas por los grupos positivos y negativos. Así, cada grupo amino de una proteína es capaz de unirse a 2,6 moléculas de agua.

Además, el agua interviene en la eliminación de sustancias de la célula y en la absorción de calor —gracias a su elevado coeficiente calórico—, lo que evita cambios drásticos de temperatura en la célula.

Otra importante propiedad del agua es su ionización en un anión hidroxilo (OH^-) y un ion hidrógeno o protón (H^+). En condiciones de temperatura y presión estándar, solo se disocian 1×10^{-7} moles por litro de moléculas de agua; a esta concentración corresponde el pH neutro 7.

Las sales disociadas en aniones (por ejemplo, Cl^-) y cationes (Na^+ y K^+) son importantes para mantener la presión osmótica y el equilibrio ácido-base de la célula. La retención de iones produce un aumento en la presión osmótica y por lo tanto la entrada de agua.

Algunos de los iones inorgánicos (por ejemplo, el Mg^{2+}) son indispensables como cofactores enzimáticos. Otros, como el fosfato inorgánico, forman parte del compuesto adenosina trifosfato (ATP), que es la principal fuente de energía para los procesos vitales de la célula. Además integra otras moléculas, como los fosfolípidos, las fosfoproteínas y los azúcares fosforilados. Otros iones que existen en las células son el sulfato, el carbonato, el bicarbonato, etcétera.

La concentración de los iones difiere dentro de la célula y en el líquido que la rodea. Así, la célula tiene una alta concentración de K^+ y Mg^{2+} , mientras que el Na^+ y el Cl^- están localizados principalmente en el líquido intercelular. Los aniones predominantes en las células son el fosfato y el bicarbonato. Los iones de Ca^{2+} que se hallan en las células desempeñan un importante papel como reguladores.

Ciertos minerales se encuentran en forma no ionizada. Así ocurre con el hierro, que en la hemoglobina, la ferritina, los citocromos y en algunas enzimas se halla ligado por uniones carbono-metal.

Por otro lado, vestigios de manganeso, cobre, cobalto, yodo, selenio, níquel, molibdeno y cinc son indispensables para mantener la actividad celular normal. En los últimos años se ha dado importancia al estudio de estos elementos vestigiales (también denominados oligoelementos), algunos de los cuales se encuentran en las moléculas de ciertas enzimas.

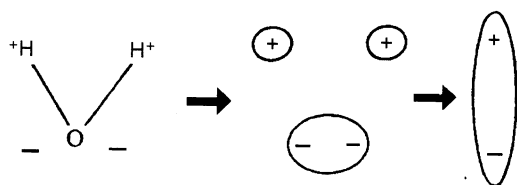


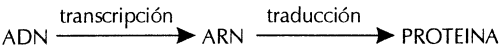
FIG. 2-1. Esquemas que muestran la distribución asimétrica de las cargas en la molécula de agua.

ACIDOS NUCLEICOS

2-3. Existen dos clases de ácidos nucleicos, el ADN y el ARN

Los ácidos nucleicos son macromoléculas de suma importancia biológica. Todos los organismos vivos contienen ácidos nucleicos en forma de *ácido desoxirribonucleico* (ADN) y *ácido ribonucleico* (ARN). Algunos virus sólo contienen ADN, mientras que otros sólo poseen ARN.

El ADN constituye el depósito fundamental de la información genética. Esta información es copiada o *transcripta* en las moléculas de ARN, cuyas secuencias de nucleótidos contienen el código para las secuencias específicas de aminoácidos. Entonces se produce la síntesis de proteínas, en un proceso llamado *traducción* del ARN. Esta serie de fenómenos ha recibido el nombre de *dogma central* de la biología molecular, que puede resumirse de la siguiente manera:



El papel biológico de los ácidos nucleicos se estudiará detalladamente en los capítulos 11 a 14; aquí se considerará sólo su estructura química, lo que permitirá comprender sus funciones.

En las células superiores el ADN se halla principalmente en el núcleo integrando los cromosomas. Una pequeña cantidad se encuentra en el citoplasma, dentro de las mitocondrias y los cloroplastos. El ARN se localiza tanto en el núcleo, donde se forma, como en el citoplasma, donde tiene lugar la síntesis proteica (tabla 2-1).

Los ácidos nucleicos están formados por un azúcar (pentosa), una base nitrogenada (purina o pirimidina) y ácido fosfórico.

La hidrólisis del ADN o del ARN genera:

	ADN	ARN
Pentosa	desoxirribosa	ribosa
Bases	Purinas adenina-guanina	adenina-guanina
	Pirimidinas timina-citosina	uracilo-citosina
Acido fosfórico	PO ₄ H ₃	PO ₄ H ₃

Una molécula de ácido nucleico es un *polímero* lineal en el cual los monómeros son *nucleótidos* que están ligados por medio de *uniones fosfodiéster* (fig. 2-2). Estas uniones ligan el carbono 3' de la pentosa de un nucleótido con el carbono 5' de la pentosa del nucleótido adyacente. En consecuencia, el eje de un ácido nucleico está formado por pentosas y fosfatos, y las bases nitrogenadas están unidas a las pentosas del eje. El extremo de la molécula que contiene la pentosa con el C 5' libre se llama extremo 5', y el que posee la pentosa con el C 3' libre, extremo 3'.

Como ilustra la figura 2-2, el *ácido fosfórico* utiliza dos de sus tres grupos ácidos en las uniones 3',5'-diéster. El grupo restante confiere al polinucleótido sus propiedades ácidas y permite que la molécula forme uniones iónicas con proteínas básicas (vimos en el cap. 1-13 que el ADN de las células eucariotas está asociado con proteínas básicas llamadas *histonas*, con las que forma un complejo nucleoproteico denominado *cromatina*). Dicho grupo ácido libre también hace que los ácidos nucleicos sean basófilos (se colorean con colorantes básicos).

Las pentosas son de dos tipos: *ribosa* en el ARN y *desoxirribosa* en el ADN. La única diferencia entre estos dos azúcares es que la desoxirribosa tiene un átomo menos de oxígeno (fig. 2-2). Se puede utilizar una reacción citoquímica específica para la desoxirribosa —llamada reacción de Feulgen— para visualizar el ADN con el microscopio óptico (cap. 3-21).

Las *bases* que se encuentran en los ácidos nucleicos son también de dos tipos: pirimidinas y purinas. Las *pirimidinas* poseen un anillo heterocíclico, mientras que las *purinas* tienen dos anillos fusionados. En el ADN, las pirimidinas son la *timina* (T) y la *citósina* (C), y las purinas son la *adenina* (A) y la *guanina* (G). El ARN contiene *uracilo* (U) en lugar de timina.

Existen diferencias fundamentales entre el ADN y el ARN. El ADN tiene desoxirribosa y timina (T), mientras que el ARN posee ribosa y uracilo (U). La

TABLA 2-1. Acidos nucleicos

	Acido desoxirribonucleico	Acido ribonucleico
Localización	Principalmente en el núcleo (también en mitocondrias y cloroplastos)	Principalmente en el citoplasma (también en nucléolo y cromosomas)
Bases pirimidínicas	Citosina Timina	Citosina Uracilo
Bases purínicas	Adenina Guanina	Adenina Guanina
Pentosa	Desoxirribosa	Ribosa
Papel en la célula	Información genética	Síntesis de proteínas

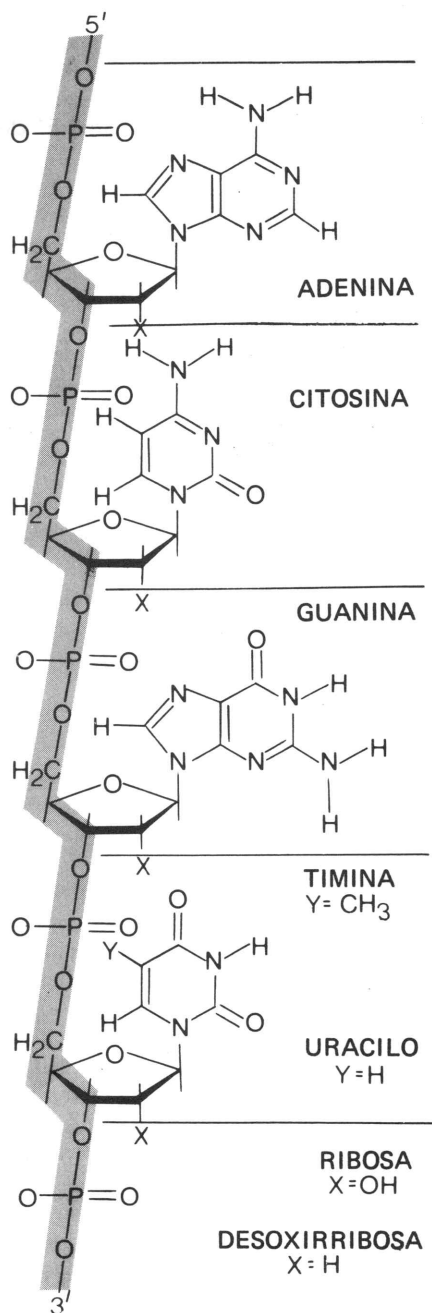


FIG. 2-2. Sector de una cadena de ácido nucleico que muestra los distintos tipos de nucleótidos que lo componen.

diferencia de las bases pirimidínicas permite usar timidina radiactiva como marcador específico del ADN, y uridina radiactiva para el ARN.

Las bases heterocíclicas absorben luz ultravioleta a 260 nm. En una célula fotografiada con esa longitud de onda se ve que el nucléolo, la cromatina y las regiones del citoplasma que contienen ARN

absorben dicha luz intensamente. En efecto, la manera más simple de determinar la concentración de ácido nucleico en una solución es medir la absorbancia a 260 nm.

La combinación de una base más una pentosa (sin el fosfato) constituye un *nucleósido*. Por ejemplo, la adenina es una base purínica, y la adenosina (adenina + ribosa) es el nucleósido (fig. 2-3). Finalmente, adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato (ADP) y adenosina trifosfato (ATP) son ejemplos de *nucleótidos* (fig. 2-3).

Además de actuar como bloques en la edificación de los ácidos nucleicos, los nucleótidos —por ejemplo, el recién citado ATP— son utilizados para depositar y transferir *energía química*. La figura 2-3 muestra que las dos uniones fosfato terminales del ATP contienen gran cantidad de energía. Cuando se produce la hidrólisis en estas uniones, la energía liberada puede ser usada por la célula para realizar sus actividades. La unión $\sim P$ de alta energía permite que la célula acumule gran cantidad de ella en un espacio muy pequeño, y que la mantenga lista para usarla en el momento en que sea necesaria. Otros nucleótidos, como citosina trifosfato (CTP), uridina trifosfato (UTP), guanosina trifosfato (GTP) y timosina trifosfato (TTP), tienen también uniones de alta energía, pero la fuente original de energía es el ATP. En la figura 9-1 es posible apreciar cómo se utiliza la energía acumulada en el ATP para la ejecución de las diferentes actividades celulares.

El ADN se encuentra en los organismos vivos como moléculas lineales de muy alto peso molecular. Por ejemplo, la *Escherichia coli* tiene una sola molécula de ADN circular de 3.400.000 pares de bases y una longitud total de 1,4 mm. La cantidad de ADN en los organismos superiores puede ser varios cientos de veces mayor, 1.200 veces en el caso del hombre. Así, el ADN completamente extendido de una célula diploide humana puede tener una longitud total de 1,7 metro.

Toda la información genética de un organismo vivo se encuentra acumulada en la secuencia lineal de las cuatro bases del ácido nucleico. La estructura primaria de todas la proteínas (es decir, la cantidad y la secuencia de sus 20 aminoácidos) debe estar codificada por un alfabeto de cuatro letras (A,T,G,C). Uno de los descubrimientos más extraordinarios en biología molecular fue la interpretación de este *código genético*. Un paso previo a ese descubrimiento —que tuvo influencia directa en la elucidación de la estructura del ADN— fue el hallazgo de que, si bien la composición de las bases variaba de una especie a otra, la cantidad de adenina es igual a la cantidad de timina ($A = T$), y la cantidad de citosina es igual a la de guanina ($C = G$). En

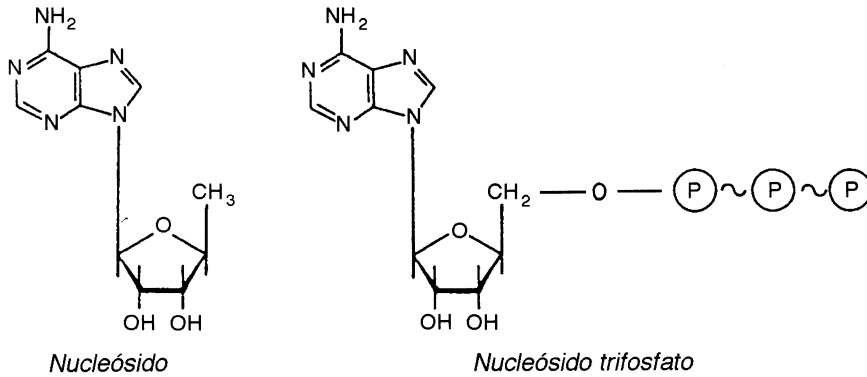


FIG. 2-3. Estructura química del nucleósido adenosina y del nucleótido adenosina trifosfato (ATP).

consecuencia, el número total de purinas es idéntico al de pirimidinas (o sea, $A + G = C + T$). No obstante, la relación AT/GC varía considerablemente entre las especies (por ejemplo, en el hombre la relación es de 1,52 y en la *Escherichia coli* es de 0,93).

2-4. El ADN es una doble hélice

En 1953, sobre la base de los datos obtenidos por Wilkins y Franklin mediante difracción de rayos X, Watson y Crick propusieron un modelo para la estructura del ADN que contemplaba las propiedades químicas antedichas, pero también las propiedades biológicas, especialmente la capacidad de duplicación de la molécula. La molécula de ADN se ilustra en la figura 2-4. Está formada por dos cadenas de ácidos nucleicos helicoidales con giro a la derecha, que componen una doble hélice alrededor de un mismo eje central. Las dos cadenas son *antiparalelas*, lo cual significa que sus uniones 3',5'-fosfodiéster siguen direcciones opuestas. Además, las bases están situadas en el interior de la hélice en un plano perpendicular al eje helicoidal.

Ambas cadenas se hallan unidas entre sí por medio de *puentes de hidrógeno*, establecidos entre los pares de bases. Puesto que entre dos pentosas de las cadenas opuestas existe una distancia fija, sólo ciertos pares de bases pueden darse dentro de la estructura. Como se advierte en la figura 2-5, los únicos pares posibles son A-T, T-A, C-G y G-C. Es importante observar que entre las A y las T se forman dos puentes de hidrógeno, y entre las C y las G, tres. En consecuencia, el par C-G es más estable que el par A-T. Junto a los puentes de hidrógeno, también las interacciones hidrofóbicas entre las bases revisten importancia para mantener estabilizada la doble estructura helicoidal.

Las secuencias axiales de las bases a lo largo de las cadenas de polinucleótidos pueden variar considerablemente, pero ambas secuencias deben ser

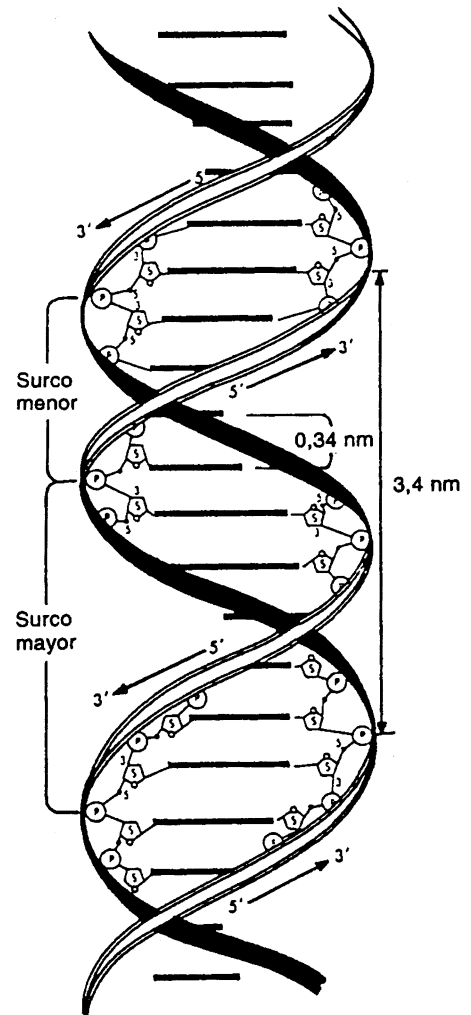


FIG. 2-4. La doble hélice del ADN. Las cadenas ribosa (S)-fosfato (P) se dibujaron como cintas. Los pares de bases son planos y perpendiculares al eje del ADN, de ahí que en esta vista lateral aparezcan representados por líneas horizontales. Nótese que las dos cadenas son antiparalelas. La doble hélice da una vuelta completa cada 10 pares de bases (3,4 nm).

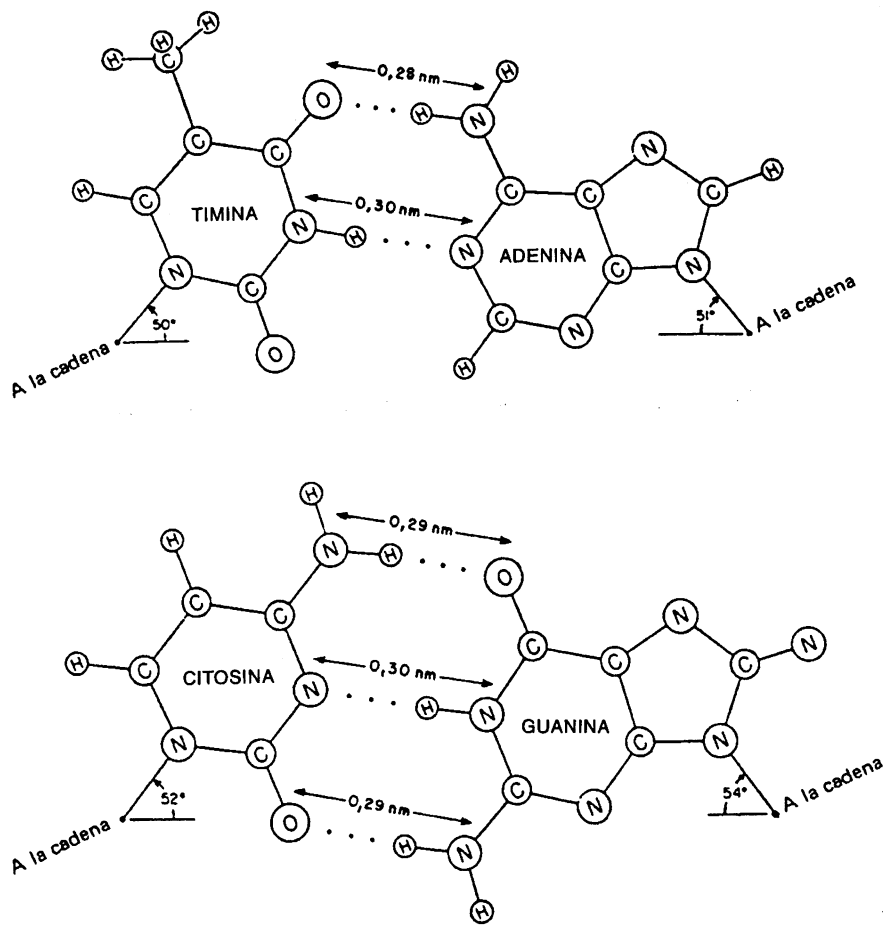
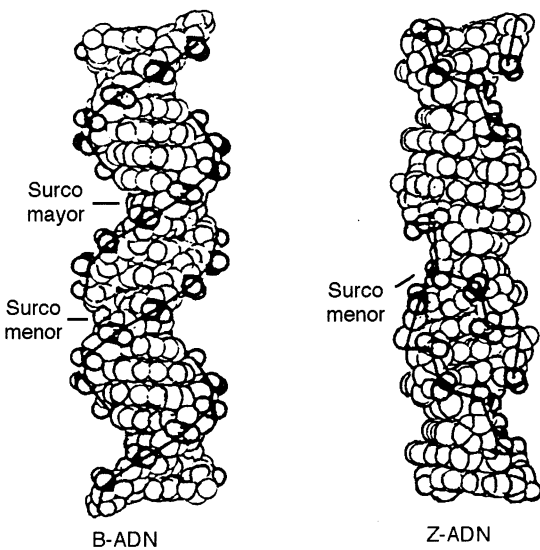


FIG. 2-5. Los dos pares de bases del ADN. Las bases complementarias son adenina y timina (A-T) y citosina y guanina (C-G). Obsérvese que en A-T hay dos puentes de hidrógeno, mientras que en C-G existen tres. La distancia entre las cadenas opuestas de ribosa fosfato es de aproximadamente 1,1 nm. (De L. Pauling y R. B. Corey, 1956.)



complementarias, como se ve en el siguiente ejemplo:

Cadena 1	5'	T	G	C	T	G	A	C	G	T	3'
Cadena 2	3'	A	C	G	A	C	T	G	C	A	5'

Debido a esta propiedad, al separarse una cadena de la otra durante la duplicación del ADN, cada una sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria. De este modo se generan dos moléculas hijas de ADN de doble cadena que tienen la misma constitución molecular que la doble cadena progenitora.

FIG. 2-6. Dos formas moleculares de la doble hélice del ADN: B-ADN, de giro a la derecha, y Z-ADN, de giro a la izquierda. La línea oscura une a los fosfatos; véase que en el B-ADN es regular y en el Z-ADN es irregular. (De A. Rich.)

2-5. Existe una forma de ADN con giro a la izquierda

Aun cuando la mayor parte del ADN contenido en una célula se presenta con su doble hélice girando hacia la derecha (*B*-ADN) —que es la configuración más estable—, también existen dobles hélices de ADN con giro a la izquierda. Esta forma se denomina *Z*-ADN, por la disposición en zigzag del eje de fosforribosa de la cadena, como puede observarse en el modelo tridimensional de la figura 2-6. En la configuración *Z*-ADN quedan expuestas partes diferentes de la molécula, lo que puede tener consecuencias biológicas. En efecto, esta configuración alternativa sugiere que el ADN es una molécula flexible, que puede adoptar formas diferentes. Se ha sugerido que las zonas de *Z*-ADN podrían ser los sitios donde los carcinógenos se unen al ADN y provocan en éste mutaciones (cambios en los nucleótidos).

2-6. El ADN puede ser desnaturalizado y vuelto a naturalizar

Teniendo en cuenta que la estructura de doble hélice en el ADN es mantenida por interacciones débiles (puentes de hidrógeno entre las bases enfrentadas), es posible separar ambas cadenas por medio del calor y otros tratamientos, como el pH alcalino. Este proceso se denomina *desnaturalización* del ADN. Como la temperatura necesaria para romper el par C-G (que tiene tres puentes de hidrógeno) es mayor que la requerida para romper el par A-T (con dos puentes de hidrógeno), la temperatura a la cual se separan las cadenas del ADN —llamada *punto de fisión*— depende de la relación CG/AT. Si el ADN desnaturalizado se enfría lentamente, las cadenas complementarias se apa-

rean en forma ordenada, y se restablece la conformación original de la molécula. Este proceso se denomina *renaturalización* o *templado*.

Un ADN de una sola cadena también puede unirse a un ARN complementario para formar una molécula híbrida, con una cadena de ADN y una de ARN. La *hibridación* molecular es un método muy útil para clasificar a los ARN, ya que la molécula de ARN formará un híbrido sólo con el ADN a partir del cual el ARN fue transcrito.

Se pueden lograr marcadores utilizando una molécula de ARN mensajero, nucleótidos radiactivos y la enzima transcriptasa inversa, que copia una cadena complementaria de ADN, llamada *ADNc*. Este ADN se puede usar para localizar el gen a partir del cual se formó la molécula de ARN.

La desnaturalización, en condiciones cuidadosamente controladas, puede utilizarse para armar el mapa de un ADN mediante la técnica conocida con el nombre de mapeo por desnaturalización parcial. Así, las regiones ricas en AT se separan con mayor facilidad y pueden ser detectadas con el microscopio electrónico como asas formadas por una sola cadena. La distancia entre las asas y el extremo de la molécula de ADN es característica para cada especie de ADN (fig. 2-7).

2-7. El ADN circular puede adoptar una conformación superhelicoidal

Muchos virus tienen una molécula de ADN circular que se identifica con el microscopio electrónico como una estructura *superenrollada* (fig. 2-8). Más aún, tal superenrollamiento es negativo, lo cual hace que la estructura del ADN se halle bajo tensión. Este fenómeno se produce por un relativo número de vueltas negativas en la doble hélice del ADN circular.

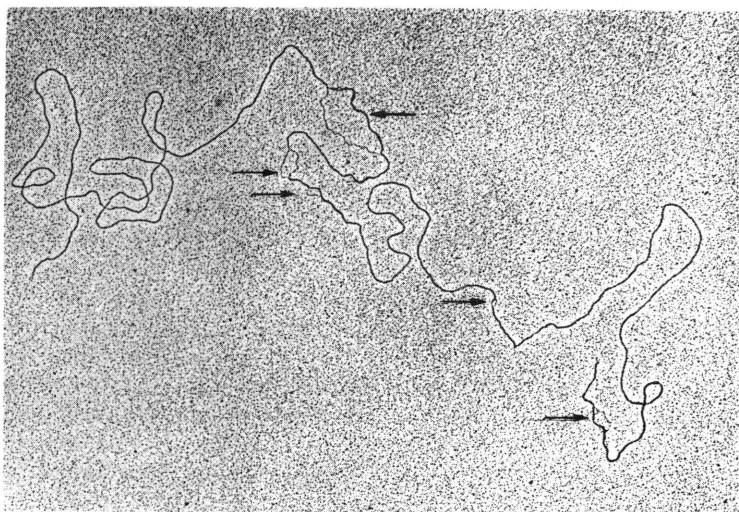


FIG. 2-7. Micrografía electrónica del ADN del bacteriófago lambda que muestra los sitios donde se ha producido la desnaturalización como resultado de la acción de un medio alcalino (pH 11). (Cortesía de R. B. Inman.)

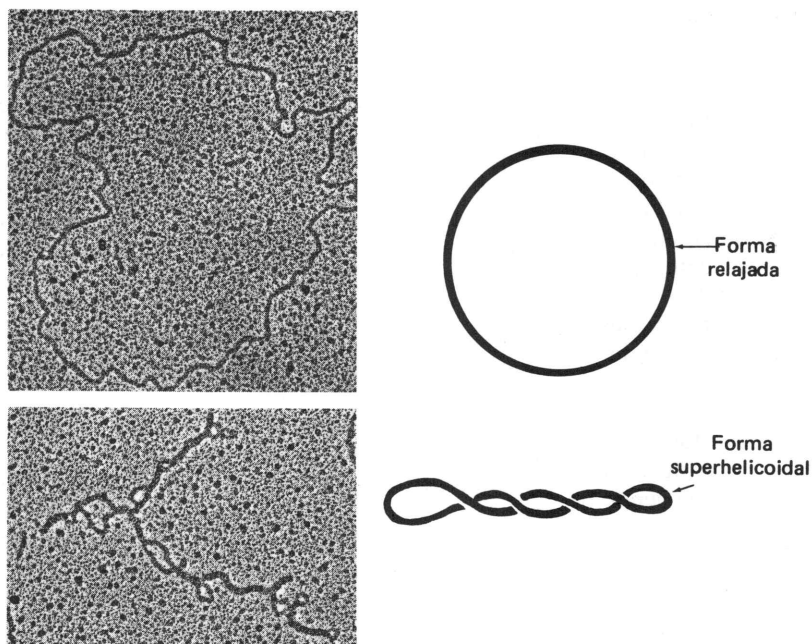


FIG. 2-8. ADN relajado y superhelicoidal del virus SV40, detectado con el microscopio electrónico. (Cortesía de S. Whytock.)

Tomemos el caso de un ADN circular con 5.000 pares de bases. En la configuración no enrollada —o relajada— (círculo liso en la figura 2-8) el ADN exhibe 500 vueltas de hélice debido a que hay 10 nucleótidos por cada vuelta de hélice normal. En el ADN superenrollado negativamente, el número de vueltas es menor. Por ejemplo, si hay 499 vueltas, se forma un enrollamiento de menos; si hay 490 vueltas, 10 menos; y así cifras cada vez menores. El número de 10 pares de bases por cada vuelta de hélice se basa en el modelo de difracción de rayos X del B-ADN. Sin embargo, mediante otros estudios se demostró que *la hélice da una vuelta cada 10,5 nucleótidos*.

2-8. Existen varios tipos de ARN

La estructura primaria del ARN es similar a la del ADN, excepto por la presencia de ribosa en lugar de desoxirribosa, y de uracilo en lugar de timina (tabla 2-1). Además, la molécula de ARN está formada por una sola cadena.

Existen tres clases principales de ARN: 1) *ARN mensajero* (ARNm); 2) *ARN ribosómico* (ARNr); y 3) *ARN de transferencia* (ARNt). Los tres intervienen en la síntesis proteica. El ARNm lleva la información genética —tomada del ADN— que establece la secuencia de los aminoácidos en la proteína. El ARNr representa el 50% de la masa del ribosoma (el otro 50% son proteínas), que es el organoide que proporciona el sostén molecular para las reacciones químicas que dan lugar a la síntesis proteica.

Los ARNt identifican y transportan a los aminoácidos hasta el ribosoma.

Aun cuando cada molécula de ARN tiene sólo una cadena de nucleótidos, no significa que sea siempre una estructura lineal simple. Las moléculas de ARN tienen extensas regiones con bases complementarias, las cuales establecen puentes de hidrógeno entre pares A-U y C-G en diferentes regiones de la misma molécula. La figura 2-9 muestra cómo la molécula de ARN puede plegarse sobre sí misma para formar estructuras llamadas asas en horquilla. En las regiones apareadas, la molécula de ARN adopta una estructura helicoidal parecida a la del ADN. Las estructuras tridimensionales generadas al plegarse las moléculas de ARN sobre sí mismas tienen importantes consecuencias biológicas.

HIDRATOS DE CARBONO

2-9. Los hidratos de carbono constituyen la principal fuente de energía para la célula

Los *hidratos de carbono*, compuestos por carbono, hidrógeno y oxígeno, representan la principal fuente de energía para la célula, y también son constituyentes estructurales importantes de la pared celular y de las sustancias intercelulares. Se clasifican, de acuerdo con el número de monómeros que contienen, en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

Los *monosacáridos* son azúcares simples con una fórmula general $C_n(H_2O)_n$. Se clasifican, sobre

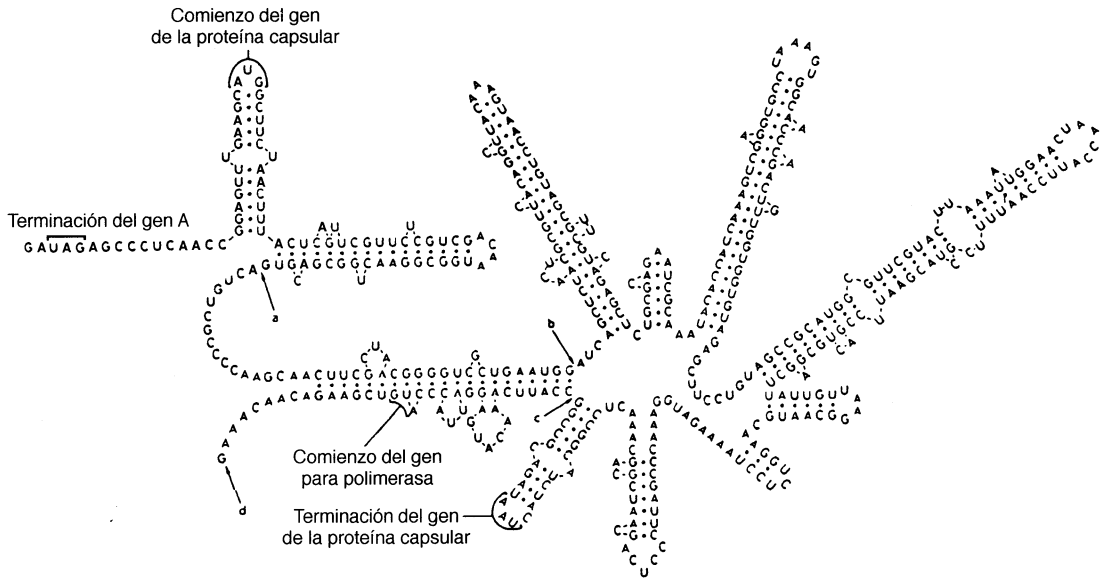


FIG. 2-9. Parte de la secuencia de nucleótidos del bacteriófago MS2, un virus que infecta a la *Escherichia coli*. La molécula se pliega formando horquillas. (Cortesía de W. Fiers.)

la base del número de átomos de carbono que contienen, en triosas, pentosas y hexosas. Como vimos, las pentosas ribosa y desoxirribosa están presentes en los ácidos nucleicos. La glucosa, que es una hexosa, constituye la fuente primaria de energía para la célula. Otras hexosas importantes son la galactosa, la fructosa y la manosa.

Los **disacáridos** son azúcares formados por la combinación de dos monómeros de hexosa, con la correspondiente pérdida de una molécula de agua. Por lo tanto, su fórmula es $C_{12}H_{22}O_{11}$. Los más importantes son la sacarosa (glucosa + fructosa) y la lactosa (galactosa + glucosa).

Los **oligosacáridos** se hallan unidos a lípidos y proteínas, de modo que en el organismo forman parte, respectivamente, de glicolípidos y glicoproteínas. Estos hidratos de carbono suelen formar cadenas ramificadas, cada una compuesta por distintas combinaciones de varios de los siguientes monosacáridos: glucosa, galactosa, manosa, fucosa, xilosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico).

Los oligosacáridos de los **glicolípidos** serán analizados junto a los lípidos, en la próxima sección.

Los oligosacáridos correspondientes a las **glicoproteínas** se hallan unidos a la cadena proteica a través de un oxígeno de una serina o de una treonina, o por intermedio del nitrógeno de la amida del aminoácido asparagina. En los enlaces **O-glicosídicos** (o uniones O) suele participar una N-acetilgalactosamina, y en los **N-glicosídicos** (o uniones N), una N-acetilglucosamina. Mientras estos dos monosacáridos son los más próximos a la proteína,

los ácidos siálicos comúnmente se localizan en la periferia del oligosacárido, casi siempre al lado de galactosas.

Los oligosacáridos enlazados mediante **uniones O** (a una serina o a una treonina) suelen presentar una galactosa unida a la primera N-acetilgalactosamina. Por su parte, los oligosacáridos enlazados por **uniones N** contienen un núcleo pentasacárido común, compuesto por tres manosas y dos N-acetilglucosaminas (una de ellas ligada a la asparagina); los restantes monosacáridos se unen a este núcleo en diferentes combinaciones, lo que da lugar a una amplia variedad de oligosacáridos, y por ende a una gran diversidad de glicoproteínas. Esto último también ocurre en los oligosacáridos enlazados mediante uniones O. El número de cadenas oligosacáridas unidas a cada proteína es muy variable.

Los **polisacáridos** resultan de la combinación de muchos monómeros de hexosas, con la correspondiente pérdida de moléculas de agua. Su fórmula es $(C_6H_{10}O_5)_n$. Al hidrolizarse dan lugar a azúcares simples. Los polisacáridos más importantes son el almidón y el glucógeno, que representan sustancias de reserva alimenticia en células vegetales y animales, respectivamente. Otro polisacárido relevante es la celulosa, el elemento estructural más importante de la pared de la célula vegetal. Estos tres polisacáridos son polímeros de glucosa, pero difieren porque sus monómeros exhiben distintos modos de unión. En la figura 2-10 puede verse que el glucógeno es una molécula ramificada en la que los monómeros de glucosa están unidos por dos tipos de enlaces químicos.

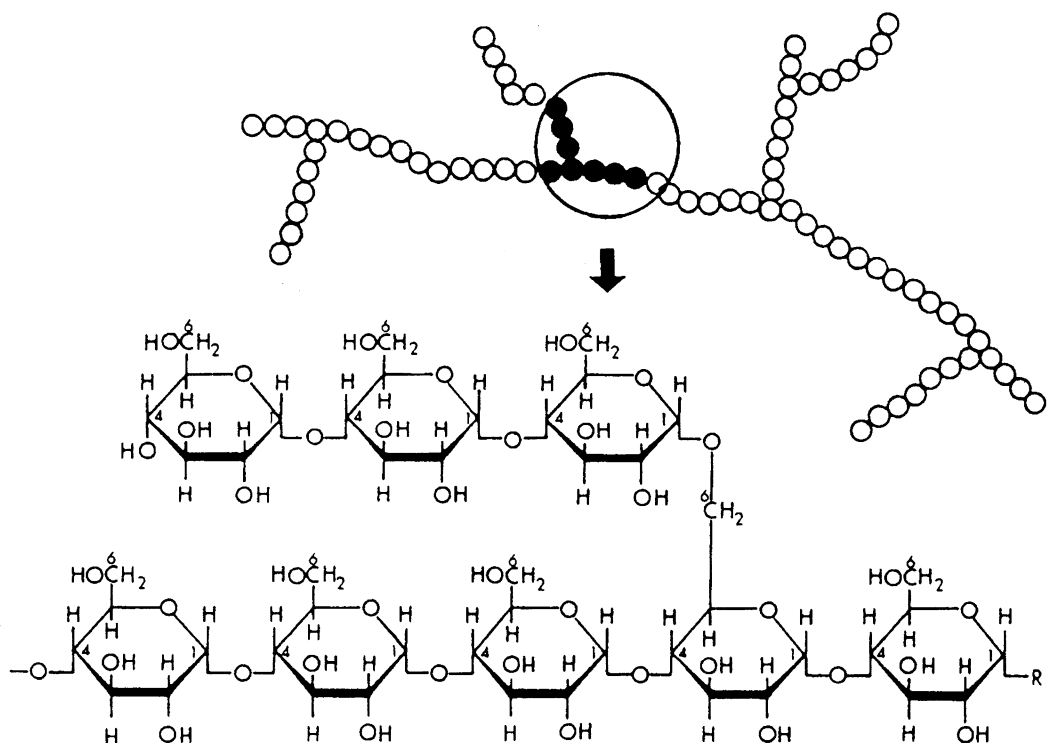


FIG. 2-10. El glucógeno es una molécula ramificada que tiene hasta 30.000 unidades de glucosa. Las uniones glucosídicas se establecen entre los carbonos 1 y 4 de glucosa, excepto en los puntos donde se ramifica (1 y 6). La parte superior de la figura muestra la molécula con pequeño aumento, mientras que la zona encerrada en el círculo es la representada en la parte inferior.

Existen polisacáridos complejos —llamados *glicosaminoglicanos*— formados por una sucesión de unidades disacáridas repetidas en las que uno de los dos monosacáridos posee un grupo amino, que puede ser una N-acetilglucosamina o una N-acetilgalactosamina. Los glicosaminoglicanos más importantes son el ácido hialurónico, el queratán sulfato, el condroitín sulfato, el dermatán sulfato y el heparán sulfato. En la tabla 6-2 se mencionan las unidades repetitivas que los integran; como puede apreciarse, con excepción del ácido hialurónico, se hallan sulfatados. Estas moléculas tienen gran importancia en la organización estructural de las matrices extracelulares, donde se encuentran combinadas con proteínas con las que forman glicoproteínas complejas llamadas *proteoglicanos*.

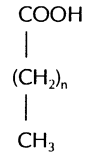
LIPIDOS

2-10. Los triglicéridos, los fosfolípidos y los esteroides son los lípidos más difundidos en la célula

Los *lípidos* son un grupo de moléculas caracterizadas por ser insolubles en agua y solubles en los

solventes orgánicos. Tales propiedades se deben a que poseen largas cadenas hidrocarbonadas alifáticas o anillos bencénicos, que son estructuras no polares o hidrofóbicas. En muchos lípidos esas cadenas pueden estar ligadas a un grupo polar que les permite unirse al agua. Los lípidos más comunes de la célula son los triglicéridos, los fosfolípidos, los glicolípidos y los esteroides.

Los *triglicéridos* (o triacilgliceroles) son triésteres de ácidos grasos con glicerol. Sus ácidos grasos están constituidos por una larga cadena hidrocarbonada, cuya fórmula general es:



Los *ácidos grasos* tienen siempre un número par de carbonos, ya que se sintetizan a partir de grupos acetilo de dos carbonos. Por ejemplo, el ácido palmítico tiene 16 carbonos, y el esteárico y el oleico, 18. La cadena hidrocarbonada suele exhibir uniones dobles ($-\text{C}=\text{C}-$), en cuyo caso se dice que el ácido graso es no saturado. Estas uniones dobles

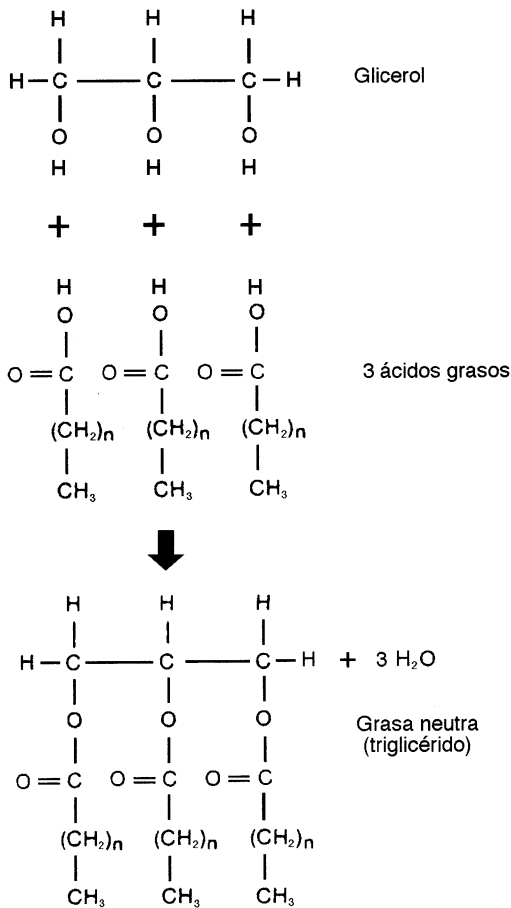


FIG. 2-11. Formación de un triglicérido a partir de una molécula de glicerol y tres ácidos grasos.

tienen importancia porque aumentan la flexibilidad de la cadena hidrocarbonada. Los grupos carboxilo de los ácidos grasos reaccionan con los grupos hidroxilo del glicerol de la manera expuesta en la figura 2-11.

Los triglicéridos sirven como reserva de energía para el organismo. Las cadenas hidrocarbonadas liberan gran cantidad de energía cuando son oxidadas, casi el doble de la que liberan los hidratos de carbono.

En las células existen dos clases de *fosfolípidos*, los glicerofosfolípidos y los esfingofosfolípidos. Los *glicerofosfolípidos* tienen dos ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol, ya que el tercer grupo hidroxilo de este alcohol se halla esterificado con un fosfato. La combinación del glicerol con los dos ácidos grasos y el fosfato da lugar a una molécula llamada *ácido fosfatídico*, que constituye la estructura básica de los glicerofosfolípidos. Estos se forman cuando el fosfato se une a un segundo alcohol, que puede ser la colina, la etanolamina, el inositol o la serina (fig. 2-12). A partir de esta fór-

mula se obtienen los glicerofosfolípidos llamados *fosfatidilcolina*, *fosfatidiletanolamina*, *fosfatidilinositol* y *fosfatidilserina*.

En la membrana interna de las mitocondrias existe un glicerofosfolípido doble llamado *difosfatidilglicerol* (o *cardiolipina*) (cap. 9-11). Lo componen dos ácidos fosfatídicos unidos por una molécula de glicerol.

Los *esfingofosfolípidos* contienen un aminoalcohol llamado *esfingosina* (o esfingol) en reemplazo del glicerol y de uno de los ácidos grasos presentes en los glicerofosfolípidos. La estructura básica de estos compuestos es la *ceramida*, molécula formada por la unión de una esfingosina con un ácido graso. El esfingofosfolípido que nos interesa es la *esfingomielina*, que se genera al agregarse una fosforilcolina (un fosfato esterificado por una colina) a la molécula de ceramida.

Como se ilustra en la figura 2-13, los fosfolípidos exhiben dos largas colas hidrofóbicas no polares (dos ácidos grasos, o un ácido graso y una esfingosina) y una cabeza hidrofílica polar, que comprende el glicerol (excepto en la esfingomielina), el fosfato y el segundo alcohol. Por lo tanto, los fosfolípidos son moléculas *anfipáticas*. Los fosfolípidos son los principales componentes de las membranas celulares, y tanto su anfipatía como las características de sus ácidos grasos (número de carbonos, presencia de dobles ligaduras) les confieren muchas de sus propiedades. Más aún, cuando los fosfolípidos se dispersan en agua, adoptan espontáneamente una organización en bicapa idéntica a la de las membranas celulares, con sus cabezas polares hacia afuera y sus colas no polares enfrentadas entre sí en la parte interior de la bicapa (cap. 4-5). Este principio de autoagregación, en el que la formación

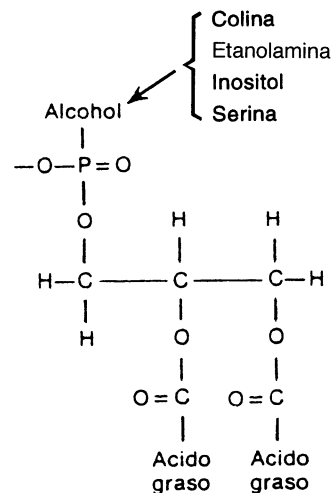


FIG. 2-12. Estructura química general de los fosfolípidos.

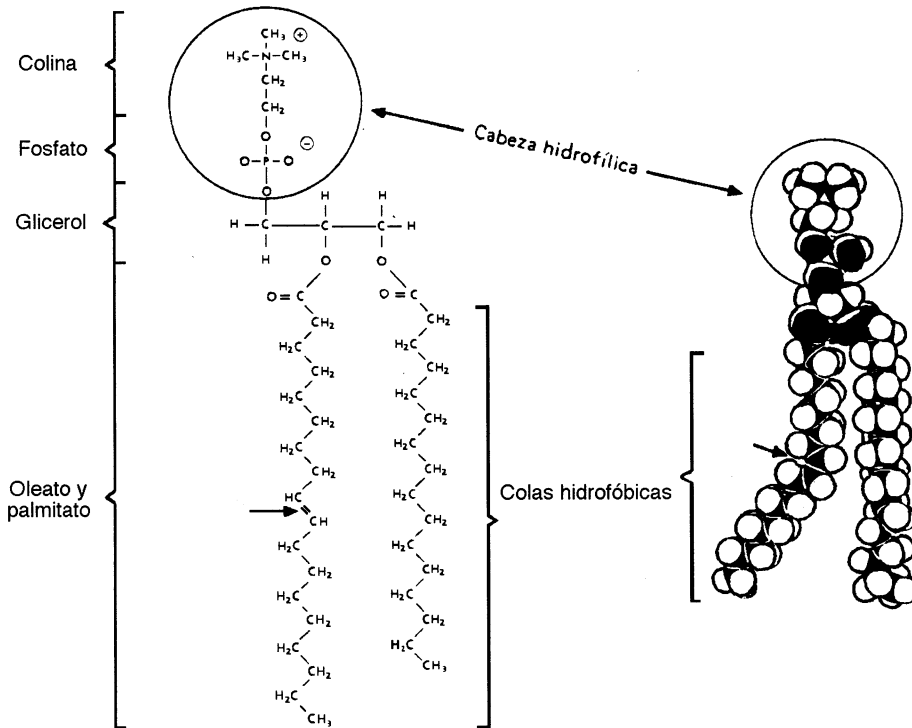


FIG. 2-13. Un fosfolípido con su cabeza hidrofílica y sus dos colas hidrofóbicas. El fosfolípido representado es el palmitoil-oleil-fosfatidilcolina. Obsérvese que la unión doble en el ácido oleico produce un cambio de dirección en la cadena hidrocarbonada (flecha). Las uniones dobles en los ácidos grasos aumentan la fluidez de las membranas celulares porque las cadenas no saturadas son más flexibles.

de estructuras complejas depende de las propiedades fisicoquímicas de los componentes moleculares, es característico de los sistemas vivientes. Por ejemplo, los virus y los ribosomas se forman sobre la base del mismo principio.

Los *glicolípidos* se clasifican en *cerebrósidos* y *gangliósidos*. Los *cerebrósidos* se forman por la unión de una galactosa o una glucosa con una molécula de ceramida. Como vemos, se trata de una esfingomielina en la que el fosfato y la colina

han sido reemplazados por un monosacárido. La estructura básica de los *gangliósidos* es similar a la de los *cerebrósidos*, pero el hidrato de carbono no es un monosacárido sino un oligosacárido integrado por varias hexosas y una a tres moléculas de ácido siálico. Existen muchos tipos de *gangliósidos*, los cuales difieren por el número, la combinación y la posición relativa de sus hexosas y ácidos siálicos. El número total de estos monosacáridos no pasa de siete. En los *gangliósidos* casi siempre la hexosa unida a la ceramida es una glucosa, y a continuación se ubica una galactosa, luego una N-acetilgalactosamina o una N-acetilglucosamina, y luego otra glucosa u otra galactosa. A veces poseen una fucosa. Los ácidos siálicos se ubican en las partes periféricas del oligosacárido.

Los *esteroides* son lípidos que derivan de una molécula compleja, el ciclopentanoperhidrofenantreno. Uno de los más difundidos es el colesterol, que se encuentra en las membranas y en otras partes de la célula y también fuera de ella (fig. 2-14). El hidroxilo en su C3 le confiere propiedades anfipáticas. Los esteroides asumen diferentes funciones según los grupos químicos unidos a su estructura básica. Por ejemplo, la vitamina A y varias

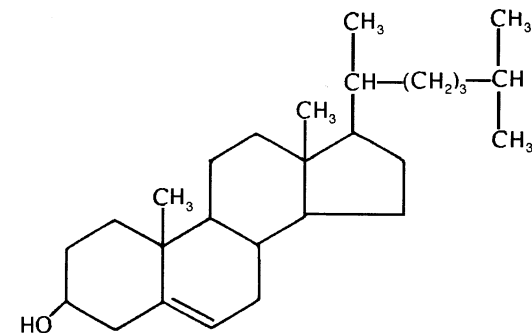


FIG. 2-14. Molécula de colesterol, derivada del ciclopentanoperhidrofenantreno.

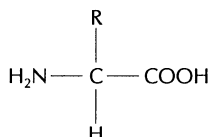
hormonas (estrógenos, progesterona, testosterona, cortisol, etc.) son esteroides.

En la membrana del retículo endoplasmático existe un lípido poliisoprenico llamado *dolicol*, que es un compuesto constituido por una cadena de 17 a 21 unidades isoprenicas, las cuales contienen entre 85 y 105 átomos de carbono. El dolicol se halla esterificado con fosfato —forma así dolicol fosfato— y desempeña un papel crucial en la incorporación de los oligosacáridos a las cadenas proteicas durante la formación de algunas glicoproteínas (cap. 8-8).

PROTEINAS

2-11. Las proteínas son cadenas de aminoácidos ligados por uniones peptídicas

Las unidades que componen las *proteínas* son los aminoácidos. Un aminoácido es un ácido orgánico en el cual el carbono unido al grupo *carboxilo* ($-\text{COOH}$), llamado carbono α , está unido también a un grupo *amino* ($-\text{NH}_2$). Además, el carbono se halla ligado a una *cadena lateral* (R), que es diferente en cada tipo de aminoácido.



Por ejemplo, en la alanina la cadena lateral R tiene un solo carbono, mientras que en la leucina tiene cuatro.

La figura 2-15 muestra la estructura de los 20 aminoácidos que son codificados en las células. Dos son *ácidos* (ácido aspártico, ácido glutámico); tres son *básicos* (histidina, lisina, arginina); siete son *neutros y polares*, es decir, hidrofílicos (serina, treonina, tirosina, triptófano, asparagina, glutamina, cisteína); y ocho son *neutros no polares*, es decir, hidrofóbicos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, prolina, metionina). Adviértase que dos de estos aminoácidos contienen un átomo de azufre. Así, entre dos cisteínas se puede formar un puente disulfuro ($-\text{S}-\text{S}-$) (fig. 2-17), de tipo covalente porque los átomos de H de ambos grupos $-\text{SH}$ son eliminados. Comúnmente se abrevian los nombres de los aminoácidos utilizando sus tres primeras letras.

La combinación de los aminoácidos para formar una molécula proteica se produce de modo tal que el grupo NH_2 de un aminoácido se combina con el grupo COOH del aminoácido adyacente, con pérdida de una molécula de agua (fig. 2-16). La unión $-\text{NH}-\text{CO}-$ se conoce como *unión peptídica*. La molécula formada mantiene su carácter anfoté-

rico, ya que siempre existe un grupo NH_2 en un extremo (amino-terminal) y uno COOH en el otro (carboxilo-terminal), además de los residuos laterales que son básicos o ácidos (fig. 2-16).

Una combinación de dos aminoácidos constituye un dipéptido; de tres, un tripéptido. Cuando se unen entre sí unos pocos aminoácidos, el compuesto es un oligopéptido (fig. 2-16). Un *polipéptido* está formado por muchos aminoácidos, a veces hasta 1.000 o más.

La distancia entre dos uniones peptídicas es de aproximadamente 0,35 nm. Una proteína con peso molecular de 30.000 está constituida por 300 residuos de aminoácidos y, extendida, tiene una longitud de 100 nm, un ancho de 1 nm y un espesor de 0,46 nm.

El término proteína (del griego *proteuo*, yo ocupo el primer lugar) sugiere que todas las funciones básicas de las células dependen de proteínas específicas. Se puede decir que no existe vida sin proteínas. Están presentes en cada célula y en cada organelo celular, y pueden ser estructurales o enzimáticas.

Las propiedades de las proteínas varían considerablemente. Las proteínas *fibrosas*, como la queratina y el colágeno, son insolubles, mientras que las *globulares*, como la albúmina y las proteínas sanguíneas, son solubles en agua y sus moléculas adquieren una configuración esférica.

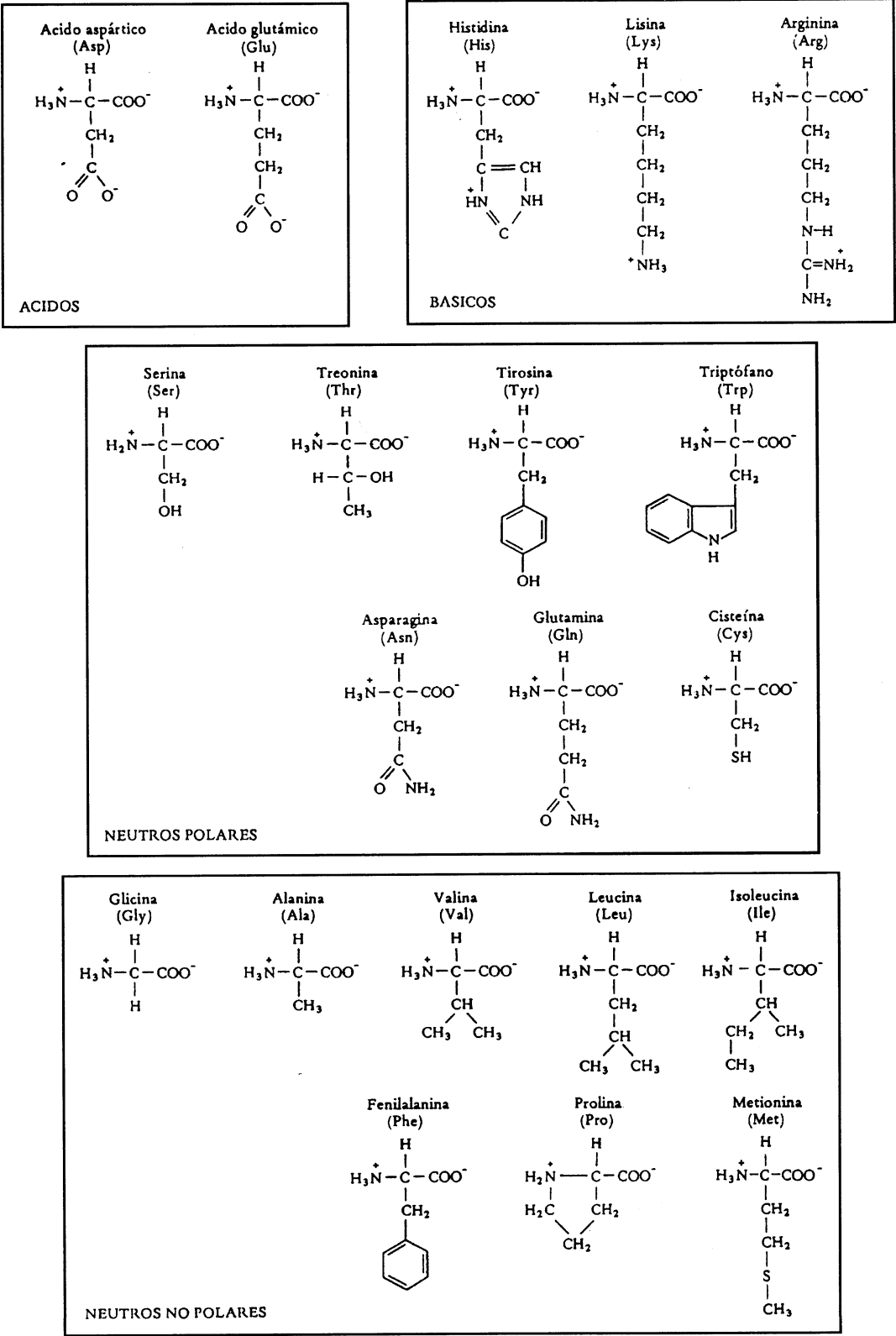
También existen *proteínas conjugadas*, unidas a porciones no proteicas (grupos prostéticos). A esta categoría pertenecen las nucleoproteínas (asociadas con ácidos nucleicos), las glicoproteínas (con hidratos de carbono), las lipoproteínas (con grasas) y las cromoproteínas, con un pigmento como grupo prostético. Dos ejemplos de cromoproteínas son la hemoglobina y la mioglobina, en las cuales el grupo prostético es el *hem*, compuesto orgánico que contiene hierro y se combina con oxígeno.

2-12. Existen cuatro niveles de organización estructural en las proteínas

En la estructura de las proteínas se distinguen cuatro *niveles de organización*.

La *estructura primaria* comprende la secuencia de los aminoácidos que forman la cadena proteica (fig. 2-17). Tal secuencia determina los demás niveles de organización de la molécula. La importancia biológica de la secuencia de los aminoácidos encuentra un ejemplo en la enfermedad hereditaria llamada anemia falciforme, en la cual se producen profundas alteraciones funcionales por la sustitución de un solo aminoácido en la molécula de hemoglobina.

La *estructura secundaria* de la proteína es una configuración espacial que deriva de la proximidad



Glicina
(Gly)

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\ | \\ \text{H} \end{array}$$

Alanina
(Ala)

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$$

Valina
(Val)

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$$

Leucina
(Leu)

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$$

Isoleucina
(Ile)

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$$

Fenilalanina
(Phe)

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$$

Prolina
(Pro)

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{COO}^- \\ | \quad | \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \backslash \quad / \\ \text{CH}_2 \end{array}$$

Metionina
(Met)

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{S} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$$

NEUTROS NO POLARES

FIG. 2-15. Estructura química de los veinte aminoácidos, clasificados en ácidos, básicos, neutros polares y neutros no polares. Las estructuras que se encuentran debajo de los grupos amino y carboxilo conservados son las cadenas laterales R.

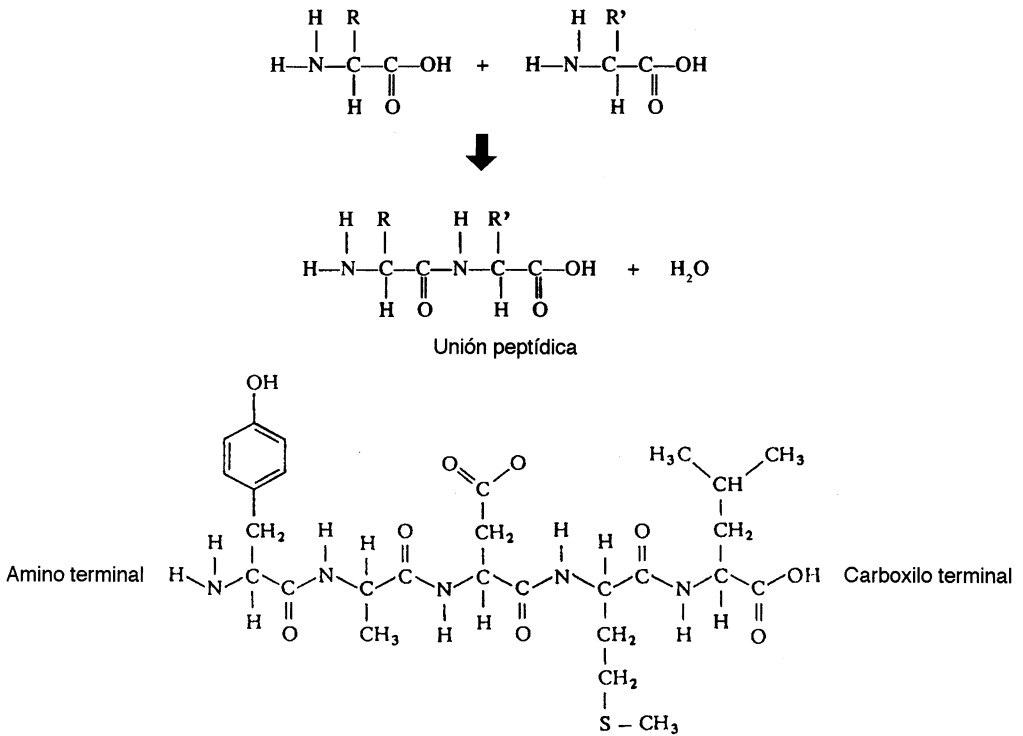


FIG. 2-16. Formación de una unión peptídica entre dos aminoácidos y un pentapéptido integrado, desde el terminal amino al terminal carboxilo, por una tirosina, una alanina, un ácido aspártico, una metionina y una leucina.

de los aminoácidos en la cadena peptídica. Algunas proteínas (o partes de ellas) tienen una estructura con forma de cilindro o en *hélice* α (llamada α porque fue la primera en ser descubierta). En la hélice α la cadena peptídica se enrolla alrededor de un cilindro imaginario (fig. 2-18) y se halla es-

tabilizada por puentes de hidrógeno entre el grupo amino de unos aminoácidos y el grupo carboxilo de otros aminoácidos situados cuatro residuos más adelante en la misma cadena polipeptídica. Otras proteínas (o partes de ellas) exhiben una estructura con forma de *hoja plegada* β (fig. 2-18), en la que

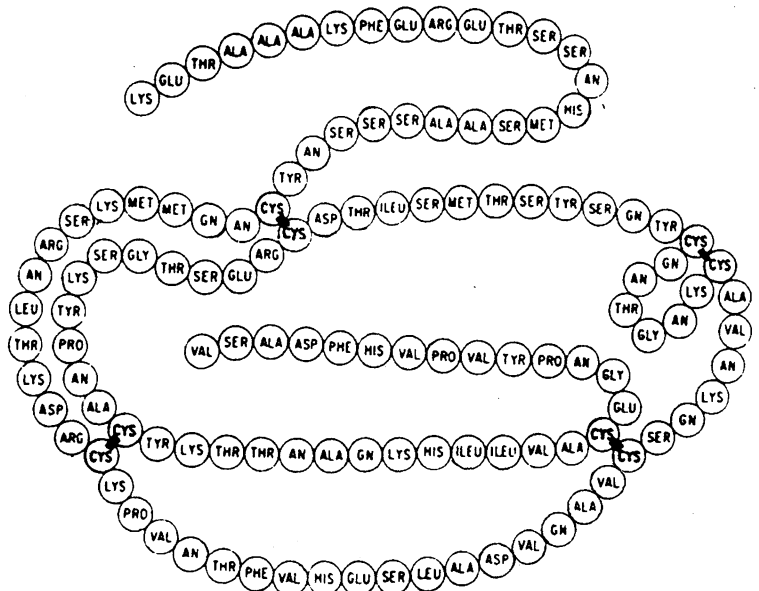


FIG. 2-17. Estructura primaria de una proteína (ribonucleasa pancreática bovina). Véase la posición de los cuatro puentes disulfuro entre los residuos de cisteína. (De C. B. Anfinsen, 1959.)

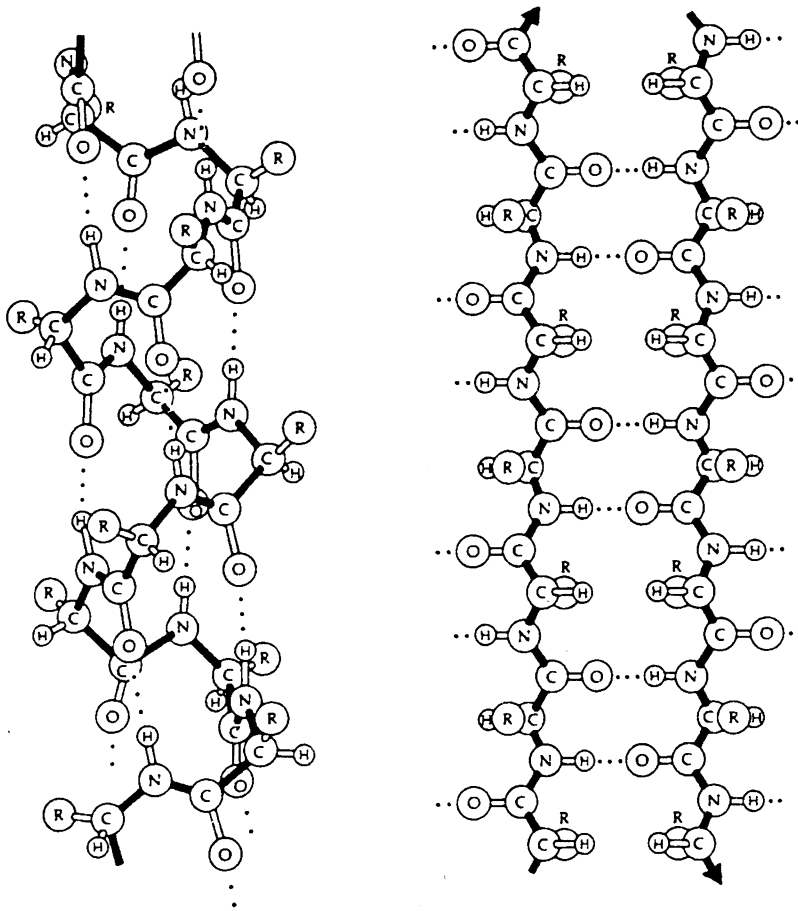


FIG. 2-18. Estructura secundaria de las proteínas: hélice α (izquierda) y hoja plegada β (derecha).

la molécula adopta la conformación de una hoja de papel plegada, y se halla estabilizada por puentes de hidrógeno entre grupos amino y carboxilo de los tramos apareados de la cadena polipeptídica.

La *estructura terciaria* está determinada por la aparición de plegamientos entre las regiones hélice α y hoja plegada β de la cadena polipeptídica, lo que da lugar a la configuración tridimensional de la proteína. Tales plegamientos se producen porque ciertos aminoácidos localizados en lugares distantes en la propia cadena proteica se relacionan químicamente.

La *estructura cuaternaria* resulta de la combinación de dos o más proteínas, para formar moléculas de gran complejidad. Por ejemplo, la molécula de hemoglobina está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos denominadas α y dos β (fig. 2-19). La separación y asociación de las subunidades puede ocurrir espontáneamente. La molécula de hemoglobina puede disociarse (por medio de la urea) en dos mitades (dos α y dos β). Cuando se retira la urea del medio, las mitades se reasocian y forman moléculas funcionales completas.

2-13. Diversos factores determinan la estructura de las proteínas

La disposición espacial de una molécula proteica se halla predeterminada por la secuencia de sus aminoácidos (estructura primaria). Ello puede demostrarse por medio de experimentos en los cuales se produce la desnaturalización (o desorganización) de la estructura terciaria por medio de altas temperaturas u otras condiciones no fisiológicas. La desnaturalización de una proteína provoca generalmente la pérdida de su actividad biológica.

La figura 2-20 demuestra, en el caso de la enzima *ribonucleasa*, que la desnaturalización puede obtenerse mediante el uso de β -mercaptoetanol y urea. El primero es un agente reductor que rompe los puentes $-S-S-$ (disulfuro) y los reduce a grupos $-SH$, mientras que la urea rompe interacciones moleculares débiles (uniones químicas no covalentes). La estructura terciaria de la ribonucleasa se produce por la presencia de cuatro puentes $-S-S-$ que se establecen entre pares de cisteínas (el aminoácido que contiene $-SH$). Luego de la desnaturalización, la enzima puede ser renaturalizada retirando gradualmente el β -mercaptoetanol y la urea; enton-

ces tanto su configuración como su actividad enzimática se recuperan (fig. 2-20). Existen 105 combinaciones posibles entre las ocho cisteínas que se aparean para producir los cuatro puentes $-S-S-$, pero sólo se obtiene la configuración natural biológicamente activa, pues es la estructura más estable desde el punto de vista termodinámico. Este ejemplo muestra que toda la información necesaria para producir el complejo plegamiento de la molécula proteica está contenida en su estructura primaria.

Los cuatro niveles de organización de las proteínas dependen de los diferentes tipos de uniones químicas entre sus átomos. Así, se producen *uniones covalentes*, como las uniones peptídicas que unen a los aminoácidos en la secuencia primaria, y los puentes $-S-S-$ que se establecen entre los grupos $-SH$ de dos residuos de cisteína. Pero también se establecen varios tipos de interacciones débiles, que son importantes para consolidar las estructuras secundaria y terciaria de las moléculas. Comprenden uniones de tipo *no covalente*, entre las que se encuentran (fig. 2-21):

1) *Uniones iónicas o electrostáticas*, que se dan como resultado de la fuerza de atracción entre grupos ionizados con carga contraria.

2) *Puentes de hidrógeno*, que se producen cuando un protón (H^+) es compartido entre dos átomos electronegativos (de oxígeno o de nitrógeno) próximos entre sí. Ya vimos que los puentes de hidrógeno son esenciales para el apareamiento específico entre las bases complementarias de los ácidos nucleicos, lo cual proporciona la fuerza que mantiene unidas a las dos cadenas del ADN y permite la codificación específica del ADN y el ARN. La figura 2-5 muestra los puentes de hidrógeno en el ADN, y la figura 2-21 en la proteína.

3) *Interacciones hidrofóbicas*, que dan lugar a la asociación de grupos no polares entre sí, excluyendo el contacto con el agua. En las proteínas globulares, las cadenas laterales más hidrofóbicas se localizan en el interior de la molécula, mientras que

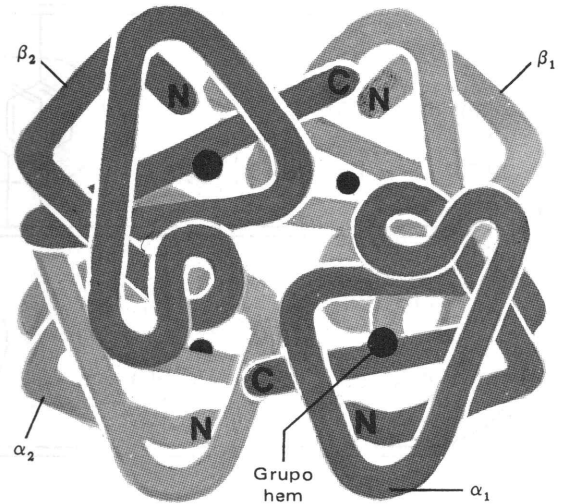


FIG. 2-19. Estructura cuaternaria de la hemoglobina. Esta proteína está compuesta por cuatro subunidades, dos α y dos β . Se indican los sitios donde se hallan localizados los cuatro grupos hem, lo mismo que los terminales amino (N) y carboxilo (C) de las cadenas polipeptídicas.

los grupos hidrofílicos se colocan en la superficie. Así, los residuos hidrofóbicos repelen a las moléculas de agua que rodean a la proteína y determinan que la estructura globular se torne más compacta.

4) *Interacciones de van der Waals*, que se producen cuando los átomos están muy cerca. Esta proximidad induce fluctuaciones en sus cargas, que dan lugar a las mutuas atracciones entre los átomos.

La diferencia fundamental entre las uniones químicas covalentes y las no covalentes reside en la cantidad de energía que se necesita para romper la unión. Por ejemplo, un puente de hidrógeno requiere $4,5 \text{ kcal/mol}^{-1}$, bastante menos que las $110 \text{ kcal/mol}^{-1}$ que necesita la unión covalente $O-H$ del agua. En general, las uniones covalentes se rompen por la intervención de enzimas, mientras que las no covalentes se disocian por fuerzas

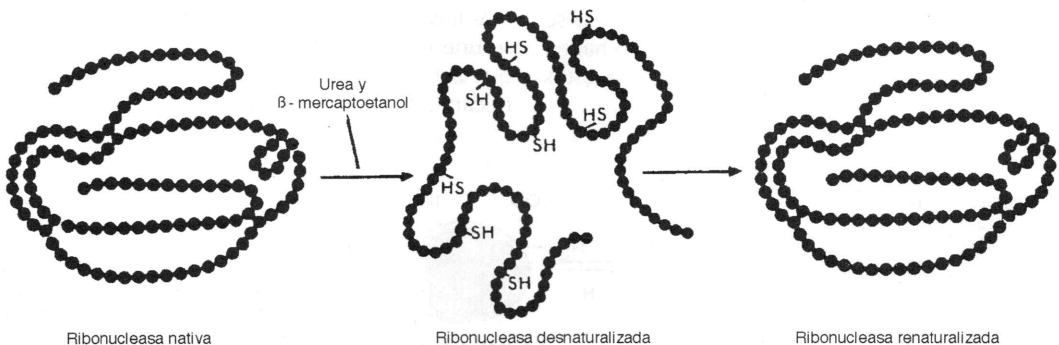


FIG. 2-20. Desnaturalización y renaturalización de una proteína (la ribonucleasa pancreática bovina de la figura 2-15). Estos procesos muestran que la información para el plegamiento de las proteínas está contenida en la secuencia de los aminoácidos.

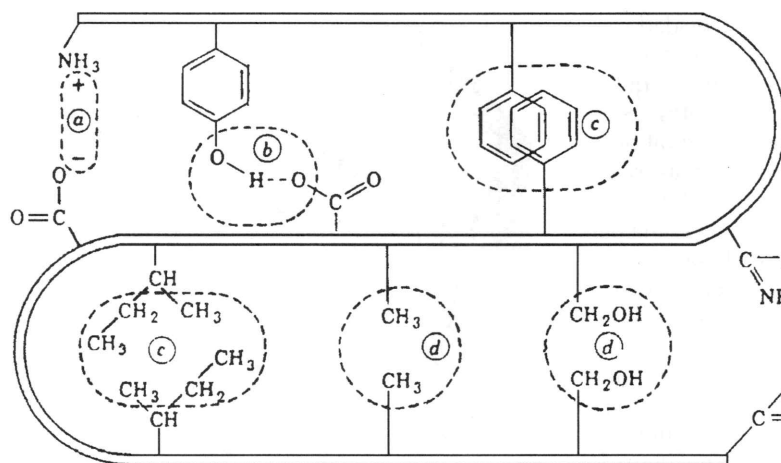


FIG. 2-21. Tipos de uniones no covalentes que estabilizan la estructura de las proteínas: a) iónica; b) puente de hidrógeno; c) interacción hidrofóbica; d) interacción de van der Waals. (De C. B. Anfinsen.)

fisicoquímicas. Aunque individualmente las uniones no covalentes son débiles, cuando son numerosas hacen que la estructura molecular se vuelva estable, como ocurre con la doble cadena del ADN.

2-14. Las proteínas tienen cargas positivas y negativas, pero en el punto isoelectrónico su carga es igual a cero

La carga real de una molécula proteica es el resultado de la suma de todas sus cargas. Dado que los grupos ácidos y básicos se disocian a distintas concentraciones de iones hidrógeno en el medio, el pH influye en la carga final de la molécula. La figura 2-22 muestra que en un medio ácido los grupos amino capturan H^+ y se comportan como bases ($-NH_2 + H^+ \rightarrow -NH_3^+$), mientras que en un medio alcalino se produce el fenómeno inverso, y los grupos carboxilo se disocian ($-COOH \rightarrow COO^- + H^+$).

Existe un pH definido para cada proteína en el cual la suma de las cargas positivas y negativas es igual a cero (fig. 2-22). Este pH se denomina *punto isoelectrónico*. En el punto isoelectrónico las proteínas colocadas en un campo eléctrico no migran a ninguno de los polos, mientras que a pH más bajo se desplazan hacia el cátodo y a pH más alto lo hacen hacia el ánodo. El proceso que da lugar a estos movimientos se llama *electroforesis*.

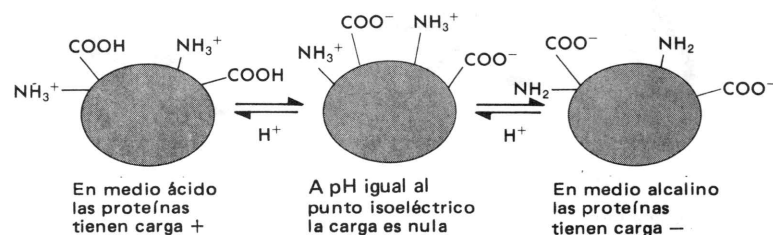


FIG. 2-22. La ionización de las proteínas depende del pH. Con la electroforesis, las proteínas en medio ácido van hacia el cátodo, mientras que en medio alcalino se dirigen hacia el ánodo.

ENZIMAS

2-15. Las enzimas catalizan las reacciones químicas

La célula puede compararse con un minúsculo laboratorio, en el cual tienen lugar la síntesis y la degradación de un gran número de sustancias. Estos procesos son efectuados por enzimas a la temperatura normal del organismo, con moderada concentración iónica y dentro de límites estrechos de pH.

Las *enzimas* son los catalizadores biológicos. Un catalizador es una sustancia que acelera las reacciones químicas sin modificarse, lo que significa que puede ser utilizado una y otra vez.

El conjunto de las enzimas constituye el grupo de moléculas más extenso y más especializado del organismo. Hasta el momento se identificaron más de mil enzimas diferentes y muchas de ellas se han obtenido en forma pura y cristalina. Esas moléculas, responsables de la dirección de la compleja red de reacciones químicas celulares, representan, por otra parte, los productos más importantes codificados por los genes contenidos en el ADN.

Las enzimas (E) son proteínas que tienen uno o más lugares denominados *sitios activos*, a los cuales se une el sustrato (S), es decir, la sustancia sobre la que actúa la enzima. El sustrato es modificado químicamente y convertido en uno o más productos

(P). Como esta reacción es generalmente reversible, puede ser expresada de la siguiente manera:



donde [ES] es un complejo enzima-sustrato intermediario. Las enzimas aceleran la reacción hasta que se alcanza un equilibrio, y pueden ser tan eficientes como para que la velocidad de la reacción sea de 10^8 a 10^{11} veces más rápida que en ausencia del catalizador.

Una característica muy importante de la actividad enzimática es su *especificidad*, de manera que cada enzima particular actúa sólo sobre un determinado sustrato. Las enzimas suelen ser tan específicas que son incapaces de actuar sobre sustancias estrechamente relacionadas, por ejemplo sobre un estereoisómero de la misma molécula.

En el capítulo 3-27 hablaremos de las endonucleasas de restricción, que cortan el ADN en medio de secuencias de nucleótidos específicas.

2-16. Algunas enzimas requieren cofactores

Para poder actuar, algunas enzimas requieren la presencia de sustancias llamadas *cofactores*. El cofactor puede ser un metal o un grupo prostético, como en el caso de las proteínas conjugadas. Otras enzimas necesitan pequeñas moléculas denominadas *coenzimas*. Por ejemplo, las deshidrogenasas necesitan una molécula de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+ o $NADP^+$) para poder funcionar. La reacción es la siguiente:



Luego los dos electrones que gana la NADH son transferidos a una segunda molécula.

2-17. Los sustratos se unen al sitio activo de las enzimas

Como vimos, las enzimas tienen una gran especificidad con sus sustratos y suelen no aceptar moléculas relacionadas o que tengan una forma ligeramente distinta. Esto puede explicarse considerando que la enzima y el sustrato exhiben una interacción semejante a la de una cerradura con su llave. En la figura 2-23 se observa que la enzima posee un sitio activo, complementario al de uno de los dominios del sustrato. Aunque la imagen de la llave y la cerradura es válida, no significa que enzimas y sustratos sean moléculas estructuralmente rígidas. En algunas, el sitio activo es complementario al sustrato sólo después de que éste se le ha unido; es el llamado *encaje inducido*. Como se observa en la figura 2-23, la unión con el sustrato induce un cambio de conformación en la enzima, y sólo entonces los grupos responsables de la catálisis entran en íntimo contacto con el sustrato.

En la unión del sustrato al sitio activo de la enzima participan fuerzas químicas de naturaleza no covalente (uniones iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals), cuyo radio de acción es muy limitado. Esto explica por qué el complejo enzima-sustrato sólo puede formarse si la enzima

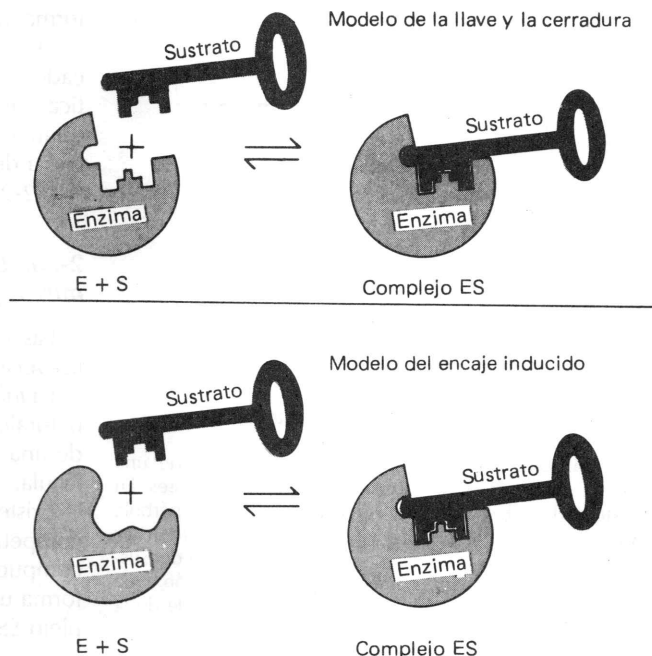


FIG. 2-23. Los sustratos reaccionan en forma muy precisa con el sitio activo de la enzima. Algunas enzimas tienen un encaje inducido, es decir que el sitio activo es complementario del sustrato sólo después de que éste se une a la enzima.

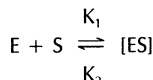
tiene un sitio exactamente complementario a la forma del sustrato.

En términos moleculares, pueden considerarse dos etapas en el funcionamiento de una enzima: 1) la formación del complejo específico; y 2) la etapa catalítica propiamente dicha, en la cual se producen los diferentes reacciones catalíticas (hidrataciones, deshidrataciones, transferencias de grupos, oxidaciones, reducciones, etc.).

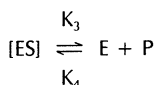
2-18. El comportamiento cinético de muchas enzimas se define por los parámetros K_m y $V_{m\acute{a}x}$

La existencia del complejo enzima-sustrato (ES) en el sitio activo ha sido demostrada mediante métodos espectroscópicos y por el aislamiento directo de derivados covalentes estables del complejo.

La reacción se realiza en dos etapas. La primera puede escribirse de la siguiente manera:



En el segundo paso, el complejo ES se desdobra en el producto y la enzima, que queda disponible para actuar sobre una nueva molécula de sustrato:



K_1 , K_2 , K_3 y K_4 son constantes de velocidad de las reacciones.

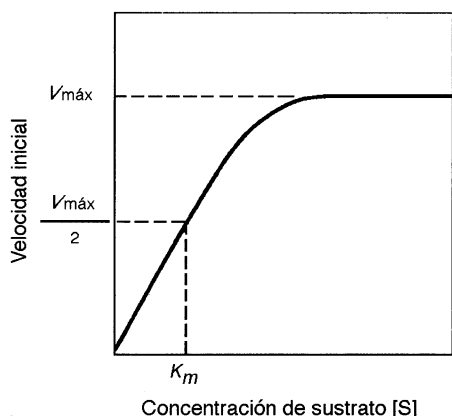


FIG. 2-24. Diagrama de la velocidad de reacción de una enzima a concentraciones de sustrato cada vez mayores. En el texto se describen la K_m y la $V_{m\acute{a}x}$. La curva es una hipérbola cuya primera parte sigue una cinética de primer orden (es decir, la reacción es proporcional a la concentración del sustrato) y la segunda parte corresponde a la saturación, que tiene una cinética de orden cero (ya que no depende de la concentración del sustrato).

Como se ilustra en la figura 2-24, la velocidad de la reacción depende de la concentración del sustrato. A bajas concentraciones, la velocidad inicial (V) de la reacción describe una *hipérbola*. No obstante, a medida que aumenta la concentración del sustrato la reacción se satura y alcanza una meseta. En este punto —que corresponde a la $V_{m\acute{a}x}$ — toda la enzima interviene en la formación del complejo ES. La ecuación de la curva es:

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x}(S)}{K_m + (S)}$$

donde K_m es la constante de Michaelis, que experimentalmente puede definirse como la concentración del sustrato en la que la mitad de las moléculas de la enzima forman complejos ES. Cuanto menor es el valor de K_m , mayor será la afinidad aparente de la enzima por el sustrato. En consecuencia, el comportamiento cinético de una enzima está definido por los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m .

2-19. Algunas enzimas están sujetas a regulaciones alostéricas

Dijimos que si se diagrama la velocidad de reacción de una enzima en función de la concentración creciente del sustrato, se observa que la curva para muchas enzimas dibuja una hipérbola (fig. 2-24). A medida que se agrega más sustrato aumenta la cantidad de la enzima en el complejo ES, y aumenta la velocidad de aparición del producto. Con altas concentraciones del sustrato, casi todas las moléculas de la enzima se localizan en el complejo ES, y se obtiene la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) de la reacción. Este tipo de cinética se encuentra en enzimas formadas por una sola cadena polipeptídica.

Otras enzimas —formadas por dos, cuatro o más cadenas de polipéptidos— no obedecen a la cinética antedicha, ya que muestran cooperatividad y están sujetas a regulaciones alostéricas; dan una curva de tipo *sigmoidea* en lugar de una hipérbola (fig. 2-25).

2-20. Los inhibidores de las enzimas son muy específicos

Las enzimas pueden ser inhibidas reversible o irreversiblemente.

La *inhibición irreversible* puede deberse a la desnaturalización de la enzima, o bien a la formación de una unión covalente entre la enzima y otra molécula.

Existen dos formas de *inhibición reversible*: la competitiva y la no competitiva. En la primera, un compuesto de estructura similar a la del sustrato forma un complejo con la enzima, análogo al complejo ES. En la inhibición no competitiva, el inhibi-

dor y el sustrato no se relacionan estructuralmente pero se unen por otros puntos de sus moléculas; este tipo de inhibición no puede anularse con concentraciones altas del sustrato.

2-21. Los zimógenos son formas inactivas de enzimas

Muchas de las enzimas que se secretan, al liberarse de la célula, se hallan en un estado inactivo. Adquieren su actividad posteriormente, en general por la acción de otras enzimas. Tal es lo que ocurre, por ejemplo, con el tripsinógeno secretado por el páncreas (se utiliza en el intestino para la digestión de algunos alimentos). Esta enzima se halla como un precursor inactivo —llamado *zimógeno* o *proenzima*— en las vesículas secretorias situadas en el citoplasma de las células pancreáticas. La proenzima es activada —se transforma en tripsina— en la luz del intestino mediante la intervención de una proteasa que corta la cadena polipeptídica del tripsinógeno, lo que permite la exhibición de su sitio activo. Este mecanismo impide que las enzimas digieran a las propias células pancreáticas. Una activación parecida de proenzimas se observa en el proceso de coagulación de la sangre.

2-22. La célula no es una bolsa llena de enzimas

Las enzimas catalizan miles de reacciones químicas que tienen lugar en las células. En algunos casos las enzimas de una vía metabólica se encuentran en el citosol, y el sustrato y los sucesivos productos se difunden de una enzima a la siguiente en forma encadenada. En otros casos, las enzimas que intervienen en una cadena de reacciones se hallan aso-

ciadas y actúan juntas bajo la forma de un complejo multienzimático; por ejemplo, las enzimas que sintetizan los ácidos grasos se encuentran íntimamente vinculadas. Los sistemas multienzimáticos facilitan las sucesivas reacciones porque éstas se producen a escasa distancia unas de otras. Las enzimas poseen patrones de distribución bastante específicos. Por ejemplo, algunas enzimas hidrolíticas se hallan empaquetadas en los lisosomas, otras en las cisternas del complejo de Golgi, y otras, como las ARN polimerasas y las ADN polimerasas, se localizan en el núcleo.

EL ORIGEN DE LAS CELULAS

2-23. Los componentes biológicos exhiben distintas clases de organización

Algunos de los constituyentes moleculares de la célula pueden asociarse entre sí y organizarse en unidades supramoleculares, las que a su vez forman parte de las estructuras que pueden ser reconocidas por medio del microscopio electrónico.

Las unidades elementales del organismo se clasifican, sobre la base de una consideración geométrica simple, en: 1) unidimensionales (fibrosas), cuando las moléculas se hallan asociadas linealmente a lo largo de un solo eje; 2) bidimensionales (membranosas), si se extienden en dos dimensiones; y 3) tridimensionales, cuando constituyen partículas cristalinas o amorfas.

En ciertos sistemas, las estructuras supramoleculares pueden agregarse para formar tipos superiores de organización, visibles con el microscopio y aun a simple vista. Existen diversos componentes con este tipo de organización, tanto en los tejidos vegetales como en los animales. Se dividen en tres categorías: 1) subcelulares, que abarcan partes de las células, como las membranas, los cilios, los cromosomas, etc.; 2) extracelulares, como las fibras colágenas y elásticas o las membranas de celulosa y de quitina, todas situadas por fuera de las células; y 3) supracelulares, que comprenden formaciones macroscópicas, como el pelo, el hueso y el músculo, en las cuales existe una organización supramolecular más compleja. Algunos sistemas supramoleculares cumplen funciones mecánicas, como las fibras colágenas en el tejido conectivo, las de fibrina en la coagulación sanguínea, o las proteínas que producen la contracción muscular. Otros tienen propiedades catalíticas y pueden formar complejos multienzimáticos. Otra función importante de estos sistemas es la de almacenar y transmitir información, particularmente a través de los ácidos nucleicos. Puede decirse que la mayoría de las funciones fundamentales de los sistemas biológicos, como los potenciales eléctricos, la permeabilidad de las

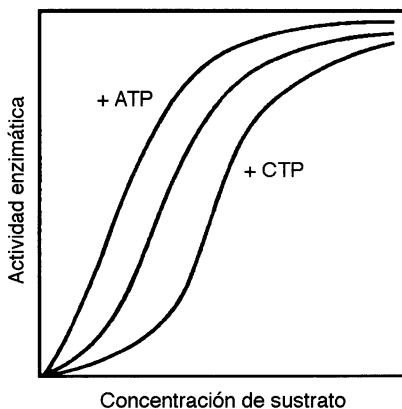


FIG. 2-25. Cinética de la enzima alostérica ATPasa, que muestra una curva sigmoidea típica en lugar de una hipérbola. Obsérvense los efectos de un activador (ATP) y de un inhibidor (CTP).

membranas, las oxidaciones, la asociación de las células, etcétera, se hallan íntimamente vinculadas con este tipo de estructuras supramoleculares.

2-24. Las proteínas y los ácidos nucleicos tienen la propiedad de autoensamblarse

En el párrafo 2-12 vimos que algunas proteínas—por ejemplo, la hemoglobina— son el resultado de un fenómeno de *autoensamblaje* de subunidades proteicas menores (fig. 2-19). En el autoensamblaje, las subunidades proteicas contienen la información necesaria para producir el complejo definitivo mediante determinadas uniones químicas. Así pueden formarse macromoléculas complejas e incluso estructuras subcelulares.

Además del autoensamblaje simple, en el que no intervienen otros componentes que no sean las subunidades participantes, existe el mecanismo de autoensamblaje dirigido, en el cual algunas enzimas preparan a las moléculas para su agregación.

Un ejemplo de autoensamblaje es el de los virus, formados a partir del material genético que contienen (ADN o ARN) y de las proteínas de la cápside. Cuando se encuentran fuera de la célula huésped los virus son metabólicamente inertes. Una vez en

la célula huésped emplean su propia información genética para programar la replicación de nuevo material genético y la fabricación de los restantes componentes virales, para lo cual utilizan la maquinaria biosintética de la célula infectada. Por ejemplo, el *virus del mosaico del tabaco* es una masa de 40×10^3 kDa que tiene la forma de un cilindro de 16×300 nm, y contiene una molécula de ARN de 6.500 nucleótidos dispuesta en hélice, con un radio de 4 nm alrededor de una cavidad central de 2 nm. La cápside o cubierta proteica del virus está formada por 2.300 subunidades proteicas idénticas (capsómeros), de 18 kDa (fig. 2-26).

2-25. Los mecanismos de autoensamblaje dieron lugar a las primeras células

Las causas por las cuales se forman en las células las estructuras en un orden cada vez más complejo deben buscarse en la información contenida en el ADN. Esta es la que determina la estructura primaria de las proteínas, que a su vez determina las estructuras secundarias y terciarias y la formación de complejos cuaternarios. Por otra parte, de la interacción entre dos o más proteínas diferentes, y de proteínas con hidratos de carbono, con lípidos y con ácidos nucleicos, resulta la formación de complejos macromoleculares y estructuras de mayor complejidad.

Un problema fundamental es determinar los mecanismos por los cuales se originó en nuestro planeta la organización supramolecular que dio lugar a la formación de las células procariotas y eucariotas. Cualquier explicación sobre este tema es obviamente especulativa, pues tiene que ver nada menos que con el origen de la vida.

Aunque no se sabe cómo se formaron las primeras células, es posible establecer, por medio del registro de fósiles, que los organismos procariotas precedieron a los eucariotas y aparecieron hace $3,5 \times 10^9$ años. Recientes observaciones demostraron que sólo después de mil millones de años de haberse formado la Tierra aparecieron organismos semejantes a las bacterias actuales, cuyos fósiles se encontraron en antiguas rocas de Australia. Antes debió haberse producido un largo período de evolución química, en el que aparecieron moléculas provistas de carbono y los precursores macromoleculares de los organismos vivos, como aminoácidos, azúcares y bases de nucleótidos. Luego, por polimerización, se formaron estructuras de un orden cada vez más complejo. Es posible que durante este período entraran en acción todos los mecanismos de agregación antes mencionados, hasta que se formó la primera estructura supramolecular capaz de autorreproducirse (fig. 2-27).

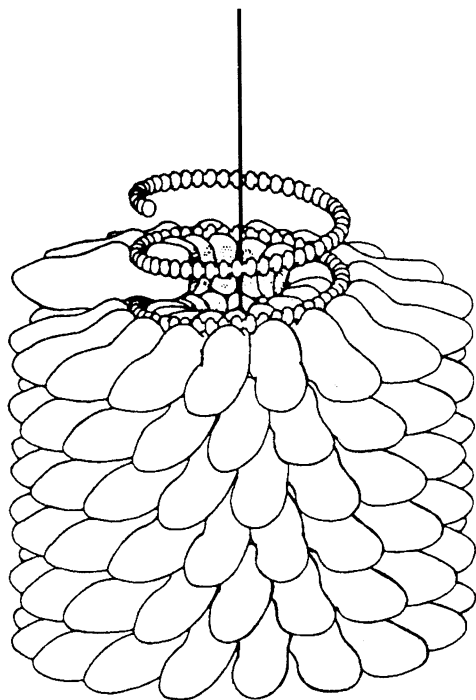


Fig. 2-26. Organización molecular del virus del mosaico del tabaco. En el centro posee una hélice de ARN, asociada con subunidades proteicas (capsómeros). Existe un monómero proteico por cada tres bases de la cadena de ARN. (De D. L. Caspar y A. Klug, 1962.)

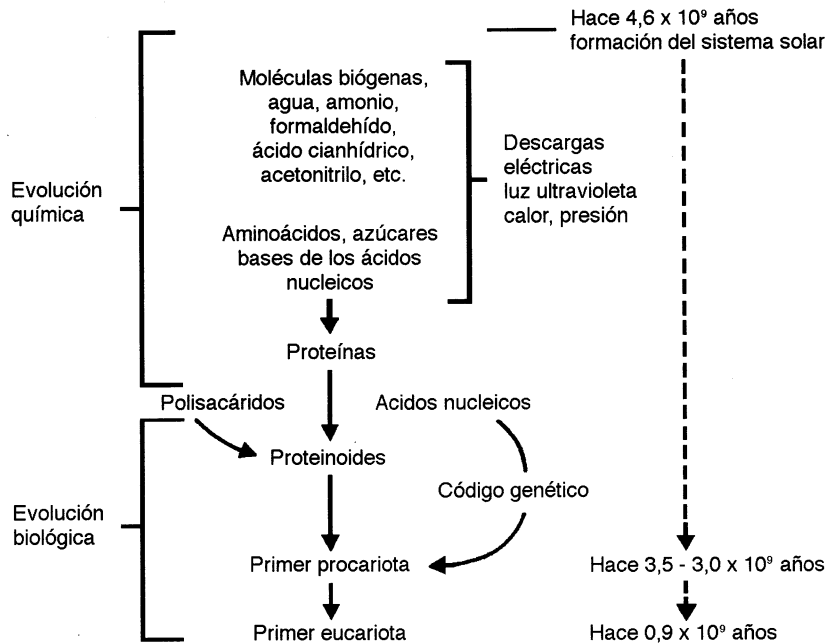


FIG. 2-27. Secuencia temporal del origen de las células.

2-26. La evolución química produjo moléculas orgánicas con carbono

En los tiempos prebióticos, es decir, anteriores a la aparición de la vida, la atmósfera de la Tierra carecía de oxígeno, como sucede con los otros planetas del sistema solar. Contenía hidrógeno, nitrógeno, amoníaco, metano, monóxido de carbono y dióxido de carbono; también agua, que en forma de vapor cubría parte de la superficie terrestre. Aunque normalmente estas moléculas son poco reactivas, podrían haber interactuado gracias a la energía provista por la radiación ultravioleta, el calor y las descargas eléctricas de los rayos.

En ese entonces la atmósfera tampoco tenía la capa protectora de ozono, de modo que los rayos ultravioletas podían bañar la superficie de la Tierra con una intensidad que resultaría mortal para la vida animal actual. Ello originó moléculas intermedias muy reactivas, como acetaldehído, cianuro, formaldehído y otras, a partir de las cuales se sintetizaron moléculas cada vez más complejas.

En 1920, Oparin y Haldane consideraron que la polimerización de estas moléculas pudo dar origen a las proteínas, los ácidos nucleicos y los hidratos de carbono presentes en los organismos vivos. En 1953, Miller hizo un experimento fundamental en el que se imitaron las condiciones de la atmósfera en el período prebiótico. Produjo descargas eléctricas en un recipiente dentro del cual se colocó agua, hidrógeno, amoníaco y metano. En el agua, que se condensó, se formaron aminoácidos, como glicina,

alanina, ácido aspártico y ácido glutámico. Mediante experimentos similares se han obtenido 17 de los 20 aminoácidos presentes en las proteínas. Otras moléculas conseguidas de esa manera son varios azúcares, ácidos grasos y las bases que integran los ácidos nucleicos.

2-27. Los mecanismos de agregación formaron los primitivos proteinoides

El próximo paso probablemente fue la polimerización de los aminoácidos para construir proteínas, lo cual pudo ser posible por la acción catalítica de las arcillas. Todos estos procesos pudieron haberse producido en medios acuosos (lagunas), en los cuales las moléculas orgánicas se concentraron formando una especie de "caldo" que favoreció las interacciones moleculares.

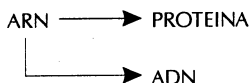
Una vez que se formó la primera proteína pudieron haber actuado los mecanismos de agregación o autoensamblaje descritos más arriba. De esta manera podrían haberse originado las funciones enzimáticas. Es probable que en el "caldo" primordial las macromoléculas hayan formado complejos más grandes, denominados *proteinoides* (o *coacervados*), que tienen una pared semejante a la de una membrana y un interior líquido. Estos proteinoides primitivos pudieron tener actividad enzimática y permeabilidad, como en el caso de las membranas artificiales que mencionaremos en el capítulo 4-5. Sin embargo, la ausencia de ácidos

nucleicos impidió su continuidad, y es posible que tuvieran una vida muy corta, dado que no podían autorreproducirse.

2-28. Las células procariotas precedieron a las eucariotas

Sólo después de la aparición de los ácidos nucleicos —y por ende del *código genético* determinado por la secuencia de sus bases— fue posible que se originara un organismo capaz de autoperpetuarse, y pudieran luego entrar en acción las leyes de la selección natural. En ese momento habría aparecido la primera célula procariota, y así la vida en la Tierra.

Es probable que el ARN, y no el ADN, haya sido el primer material genético que apareció, de modo que desde el punto de vista cronológico las macromoléculas habrían evolucionado de la siguiente manera:



Parece más simple comenzar con el ARN, debido a que puede usarse como material genético y también como ARN mensajero. La mayoría de los pasos de la maquinaria sintetizadora de proteínas depende de la interacción ARN-ARN, por ejemplo, ARNm-ARNt, ARNm-ARNr, ARNr-ARNt. La replicación del ARN es más sencilla que la del ADN, pues requiere un menor número de enzimas.

Todos los organismos vivos tienen el mismo código genético, lo cual es la mejor prueba de que la vida en la Tierra se inició de una sola vez. Las fuerzas de la evolución, al seleccionar las mutaciones favorables en las células, llevaron más tarde a una variedad casi infinita de formas de vida.

Es posible que los primeros *procariotas* fueran heterotróficos (es decir, se nutrieran de moléculas orgánicas). Más tarde aparecieron algunos procariotas autotróficos, como las algas azules, que tienen pigmentos fotosintéticos. Gracias a la fotosíntesis se produjo y acumuló el oxígeno en la atmósfera, con lo que fue posible el surgimiento de células procariotas aeróbicas.

La célula *eucariota* pudo haberse originado después de la aparición de los procariotas autotróficos. De acuerdo con ciertos restos fósiles, los organismos eucariotas debieron haber aparecido unos 1.500 millones de años atrás —al establecerse una atmósfera de oxígeno estable— y tales organismos pudieron ser primero anaeróbicos y luego aeróbicos. Hasta entonces la vida se hallaba solamente en el agua, desde donde las plantas y los animales pasaron a la tierra.

El surgimiento de la *reproducción sexual*, millones de años después, aceleró la evolución de las formas vivientes, que hasta entonces era relativamente lenta. Los sexos hicieron posible el intercambio de información genética entre los individuos, mientras que la mutación y la selección produjeron las diferentes formas vivientes que se encuentran hoy en nuestro planeta.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts B. et al. (1994) *Molecular Biology of the Cell*, 3rd Ed. Garland, New York.
- Anfinsen C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223.
- Attenborough D. (1979) *Life on Earth*, Collins, England.
- Bernal J. D. and Synge A. (1973) The origin of life. In: *Readings in Genetics and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Britten R. and Kohne D. (1968) Repeated sequences in DNA. *Science* 161:529.
- Butler P. J. G. and Klug A. (1978) The assembly of a virus. *Sci. Am.* 239:62.
- Cavalier-Smith T. (1975) The origin of nuclei and eukaryotic cells. *Nature* 256:463.
- Davidson J. N. (1976) *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 8th Ed. Chapman & Hall, London.
- Dickerson R. E. (1978) Chemical Evolution and the Origin of Life. *Sci. Am.* 239:68.
- Eigen M. (1971) Molecular self-organization and the early stages of evolution. *Q. Rev. Biophys.* 4:149.
- Fersht A. (1977) *Enzyme Structure and Mechanism*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Fox S. and Dose K. (1972) *Molecular Evolution and the Origin of Life*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Frieden E. (1972) The chemical elements of life. *Sci. Am.* 227:52.
- Jacob F. (1982) Evolution and tinkering. *Science* 196:121.
- Judson H. F. (1979) *The Eight Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*. Simon and Schuster, New York.
- Klug A. (1972) Assembly of tobacco mosaic virus. *Fed. Proc.* 31:30.
- Lehninger A. L., Nelson D. L. and Cox M. M. (1993) *Principles of Biochemistry*, 2nd Ed. Worth, New York.
- Monod J. (1971) *Chance and Necessity*. Random House, New York.
- Oparin A. I. (1974) Evolution of the concepts on the origin of life: Seminar on the Origin of Life. Moscow.
- Oparin A. I. (1978) The origin of life. *Scientia* 113:7.
- Perutz M. (1978) Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci. Am.* 239:68.
- Phillips D. C. and North A. C. T. (1975) *Protein Structure*. Oxford Biology Readers, Vol. 34. Oxford University Press, Oxford.
- Richards F. M. (1991). The protein folding problem. *Sci. Am.* 264:54.
- Rossmann M. G. and Argos P. (1978) Protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 50:497.
- Saenger W. (1984) *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer, New York.
- Schopf W. (1978) The evolution of the earliest cells. *Sci. Am.* 239:110.
- Sharon N. (1980) Carbohydrates. *Sci. Am.* 243:90.
- Spiegelman S. (1971) An approach to the experimental analysis of precellular evolution. *Q. Rev. Biophys.* 4:213.
- Stryer L. (1988) *Biochemistry*, 3rd Ed. W. H. Freeman, New York.
- Watson J. D. et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, 4th Ed. W. A. Benjamin-Cummings, Menlo Park, CA.
- Watson J. D. and Crick F. H. C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737.

3 / Métodos de estudio en biología celular

Eduardo De Robertis, José Hib y Roberto Ponzio

DIVERSOS TIPOS DE MICROSCOPIA OPTICA

En el capítulo 1 describimos los límites de resolución del ojo y los diferentes tipos de microscopios empleados (tabla 1-1).

Como es sabido, el ojo humano puede detectar diferentes longitudes de onda (colores) e intensidades de la luz visible, directamente o a través de instrumentos ópticos tales como el microscopio. En la casi totalidad de los microscopios el material biológico debe ser examinado por transparencia, vale decir que la luz debe atravesar los tejidos para formar imágenes, por lo cual es necesario estudiar células aplanadas sobre la superficie de un vidrio, o finos cortes de tejidos lo suficientemente delgados como para ser atravesados por la radiación luminosa.

La mayoría de los componentes celulares no pueden ser visualizados directamente porque son transparentes a la región visible del espectro, con excepción de algunos pigmentos que absorben luz de ciertas longitudes de onda (son sustancias coloreadas). La baja absorción de luz de la célula viva se debe a su alto contenido de agua, pero aun después de desecada sus componentes presentan muy escaso contraste. Un método para contrarrestar esta limitación es emplear colorantes que tiñan selectivamente los distintos componentes celulares. Sin embargo, las técnicas de coloración tienen el inconveniente de que en la mayoría de los casos no se pueden utilizar en las células vivas. Los tejidos en general deben ser fijados, deshidratados, embebidos en una sustancia endurecible (inclusión) y cortados en finas láminas antes de colorearlos; todos estos procedimientos son susceptibles de introducir cambios químicos y morfológicos.

3-1. El límite de resolución del microscopio indica su capacidad para resolver estructuras

Tanto en el microscopio óptico (fig. 3-1) como en cualquier otro tipo de microscopio, el poder de resolución —que es la capacidad del instrumento para dar imágenes individuales de puntos situados uno muy cerca del otro— depende de la *longitud de onda de la luz utilizada* (λ) y de la *apertura numérica* del objetivo (AN).

El límite de resolución, que se define como la distancia mínima que debe existir entre dos puntos para que puedan ser discriminados como tales, es:

$$\text{Límite de resolución} = \frac{0,61 \lambda}{AN}$$

donde la apertura numérica AN es igual a $n \cdot \sin \alpha$ (n es el índice de refracción del medio y α el semiángulo de apertura).

Puesto que matemáticamente la función seno no puede exceder de 1, y que el índice de refracción no excede de 1,6 utilizando los mejores aceites de inmersión disponibles, la AN de los objetivos rara vez alcanza más de 1,4. Con estos parámetros es fácil calcular, a partir de la fórmula precedente, que el límite de resolución del microscopio no desciende de los 170 nm (0,17 μ m) usando luz monocromática de $\lambda = 400$ nm (violeta). Con luz blanca, el límite resolutivo es de 250 nm (0,25 μ m).

3-2. Los microscopios de contraste de fases y de interferencia permiten estudiar células vivas

Se han realizado importantes adelantos en el estudio de las células vivas mediante el desarrollo de técnicas ópticas especiales, como la microscopia de

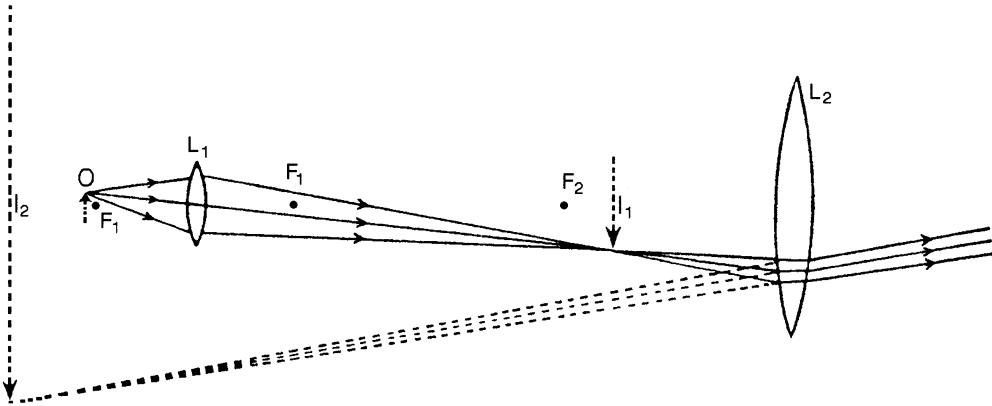


FIG. 3-1. Trayectoria de la luz en el microscopio óptico compuesto. L_1 representa al grupo de lentes del objetivo y L_2 al grupo de lentes del ocular. El objeto (O) está colocado en la platina del microscopio, justo por fuera del foco principal (F_1) del objetivo, el cual posee un foco corto. Esta lente produce una imagen real en I_1 , la que se forma por dentro del foco principal (F_2) del ocular. El ojo, mirando a través del ocular, ve una imagen virtual aumentada (I_2) de la imagen I_1 .

contraste de fases y la de interferencia. Estas técnicas posibilitan la visualización de material sin teñir, y, por lo tanto, permiten estudiar células vivas. Se basan en que, aun cuando las estructuras biológicas son sumamente transparentes a la luz visible, introducen cambios de fase o retrasos en las radiaciones que las atraviesan.

En la figura 3-2 se indican los efectos de un material transparente (A) y de un material absorbente (B) sobre un rayo de luz. En A, la onda atraviesa un material con un índice de refracción diferente del que tiene el medio. Al atravesar el objeto,

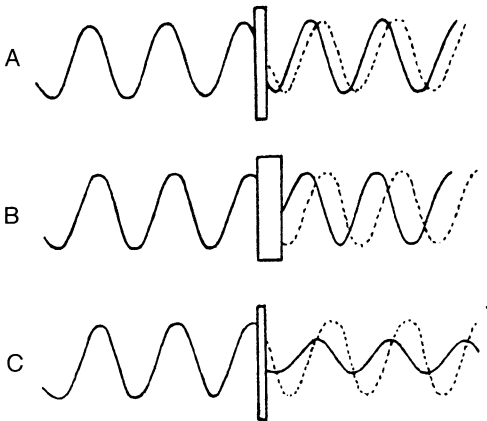


FIG. 3-2. Esquema que revela: A, el efecto de un material transparente y no absorbente de mayor índice de refracción que el medio, que introduce un cambio de fase (retardo) en la onda; B, el mismo objeto, pero más grueso, que ocasiona un retardo o cambio de fase más pronunciado; C, el efecto de un objeto transparente y absorbente, que provoca un retardo, pero también una disminución en la intensidad de la luz (amplitud).

la amplitud de la onda no cambia, pero la velocidad se altera. Si el índice de refracción en el material es mayor, ocurre una demora o retardo, que también se denomina cambio de fase. Después de salir el rayo, la velocidad se restablece, pero el retardo subsiste.

En el *microscopio de contraste de fases* los rayos laterales que pasan a través del objetivo son adelantados o retrasados un cuarto de longitud de onda ($\frac{1}{4} \lambda$) con respecto a los centrales que atraviesan el objeto, por medio de una placa anular que produce una variación en el plano focal posterior del objetivo. El efecto de fase depende de la interferencia entre la imagen geométrica directa dada por la parte central del objetivo y la imagen lateral que ha sido adelantada o retrasada $\frac{1}{4} \lambda$. Si los dos grupos de rayos se suman en contraste brillante o negativo, el objeto aparecerá más brillante que el medio que lo rodea, mientras que cuando el contraste es oscuro o positivo los dos juegos de rayos experimentan una interferencia sustractiva y la imagen del objeto es más oscura que la del medio (fig. 3-3). De este modo, los pequeños cambios de fase que se producen en el objeto son ampliados y transformados en cambios de amplitud (intensidad), que como ya vimos pueden ser apreciados por el ojo humano. El objeto transparente aparecerá entonces con diversos tonos de gris, que dependen del producto entre el espesor del objeto y las diferencias entre los índices de refracción del objeto y del medio.

La microscopia de contraste de fases se usa en la actualidad como método de rutina para la observación de células y tejidos vivos, y es particularmente valiosa en el estudio *in vivo* de células cultivadas.

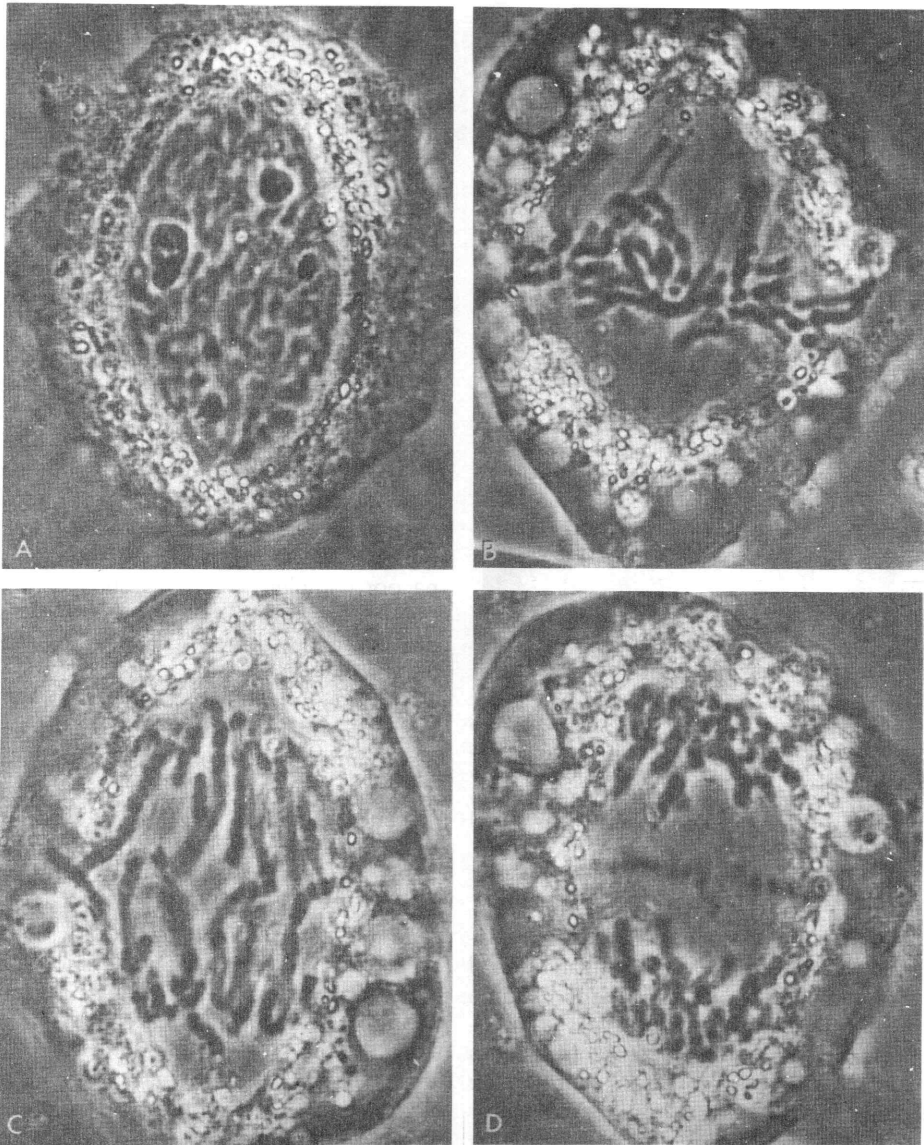


FIG. 3-3. Observación, por medio del microscopio de contraste de fases, de la división de una célula viva del tejido endospermico de *Haemantus*. La misma célula fue fotografiada en distintos momentos: A, 10:32 h; B, 12:48 h; C, 13:12 h; D, 13:21 h. En A (profase tardía) se observan los cromosomas enrollados y los nucléolos dentro del núcleo; en B (metafase) se ven los cromosomas ubicados en la placa ecuatorial; en C (anafase) los cromosomas hijos se separan; en D (telofase) los cromosomas están en los polos y puede visualizarse la formación del fragmoplasto en el plano ecuatorial. 700×. (Cortesía de A. S. Bajer.)

El *microscopio de interferencia* se basa en principios similares a los del microscopio de contraste de fases, pero tiene la ventaja de dar resultados cuantitativos e información adicional sobre las propiedades físicas de los componentes celulares. Con este instrumento es posible determinar cambios en el índice de refracción, mientras que el microscopio de contraste de fases sólo revela las discontinuidades más notables. Además, las variaciones de fase se pueden reflejar en cambios de color tan

acentuados que una célula viva es susceptible de parecerse a una preparación coloreada.

En la actualidad es muy utilizado un tipo especial de microscopio de interferencia diferencial, denominado *microscopio de Nomarski*, en el cual un único rayo de luz atraviesa el objeto y el objetivo (al igual que en el microscopio común de campo claro), pero luego es dividido en dos rayos que posteriormente se recombinan e interfieren entre sí por medio de un prisma birrefringente. Se pueden

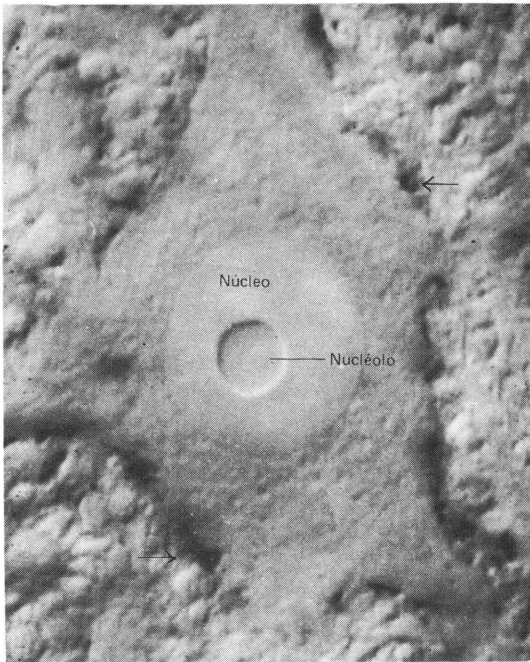


FIG. 3-4. Microfotografía obtenida mediante la óptica de Nomarski de una motoneurona. El núcleo muestra el nucléolo de gran tamaño, con el característico efecto de relieve. Las áreas oscuras en la periferia representan sitios de reacción de una técnica inmunohistoquímica que también se utilizó en este caso (PAP con anticuerpo antiserotonina, véase el parágrafo 3-6). (Cortesía de J. Pecci Saavedra y T. Pasik.)

utilizar filtros que actúan como polarizador y analizador, y un prisma compensador situado en el condensador del microscopio. La imagen resultante tiene un efecto de relieve y sombreado característico (fig. 3-4). Este microscopio presenta algunas ventajas sobre la óptica común de contraste de fases, en particular su capacidad de poder analizar preparaciones relativamente gruesas, que es una seria limitación de aquella.

El microscopio de Nomarski puede acoplarse a una cámara de televisión de alta resolución para aprovechar las ventajas de ésta en cuanto a detectar los contrastes débiles mucho mejor que el ojo humano. Las imágenes recogidas se transfieren a una computadora y se procesan digitalmente para aumentar aún más las diferencias de intensidad y disminuir la relación señal-ruido. Allen denominó a este procedimiento *microscopia de contraste video-intensificada*, que permite visualizar estructuras (vivas y en movimiento) diez veces menores que las identificables con el microscopio óptico común. Se pueden observar incluso microtúbulos aislados, pese a que su diámetro es de sólo 25 nm (fig. 3-5), y estudiar el rápido transporte de vesículas sobre su superficie.

3-3. El microscopio de fluorescencia permite identificar ciertas sustancias en muy bajas concentraciones

Las sustancias fluorescentes absorben luz de una determinada longitud de onda y emiten luz de una longitud de onda mayor. Por lo tanto, si los cortes de tejido son examinados con luz de onda corta (azul o violeta) cerca del límite inferior del espectro visible, los componentes fluorescentes del preparado emitirán luz de otro color; por ejemplo, verde amarillento.

El microscopio de fluorescencia posee una fuente de luz visible muy intensa, que es filtrada por un filtro monocromático (filtro excitador). Esta luz de onda corta ilumina el preparado y debe pasar por un segundo filtro (filtro supresor) situado dentro del tubo del microscopio. Como este segundo filtro deja pasar solamente longitudes de onda mayores (posee color verde amarillento, por ejemplo), elimina por completo la luz de onda corta, de modo que la imagen microscópica será la de total oscuridad, salvo por el eventual brillo de las sustancias fluorescentes.

En general se obtienen resultados muy superiores al iluminar el preparado directamente desde arriba (*epiiluminación*) y no a través del condensador.

Se estudian dos tipos de fluorescencia: 1) fluorescencia natural, o autofluorescencia, proveniente de sustancias que se hallan normalmente en ciertos tejidos (como los lipocromos), y 2) fluorescencia secundaria, inducida por la tinción con *colorantes fluorescentes*, denominados fluorocromos. La principal ventaja de los colorantes fluorescentes es la de su extrema sensibilidad, vale decir que es posible identificar una mínima cantidad de colorante brillando sobre un fondo oscuro.

La aplicación más importante del microscopio de fluorescencia reside en la posibilidad de unir colorantes fluorescentes, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) o la rodamina, a algunas de las inmunoglobulinas u otras moléculas utilizadas en los métodos inmunohistoquímicos (véase más adelante).

3-4. El microscopio confocal brinda imágenes nítidas de un plano óptico

Pese a que el diseño teórico de este instrumento fue patentado hace más de treinta años, su aplicación práctica fue posible sólo gracias a los avances recientes en computación.

Los objetivos de los microscopios ópticos comunes de alta resolución poseen una muy estrecha profundidad de campo (a veces denominada profundidad de foco), que es el espesor de tejido en el que se puede obtener una imagen aceptable-

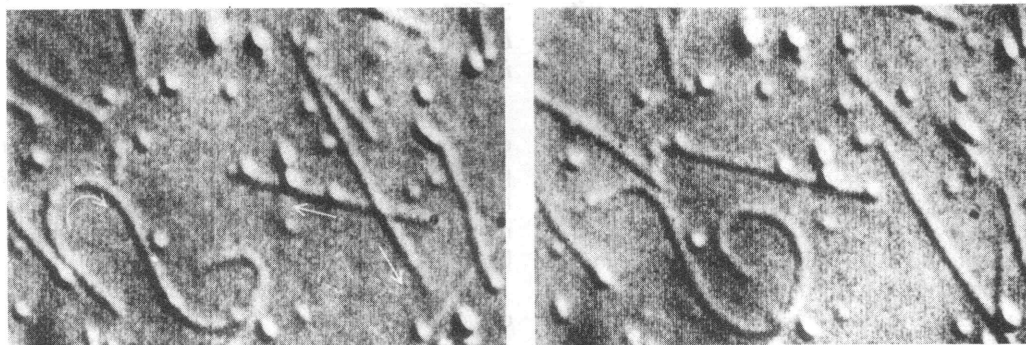


FIG. 3-5. Imágenes obtenidas con la microscopia de contraste diferencial videointensificado, registradas con un intervalo de 18 segundos. Pese a que su diámetro de 25 nm está aproximadamente diez veces por debajo del límite de resolución del microscopio óptico común, gracias al procesamiento digital se pueden observar microtúbulos aislados que se deslizan y serpentean. (De Allen R. D. [1985] Annu. Rev. Biophys. Chem. 14:265.)

mente enfocada. En las preparaciones microscópicas habituales, por encima y por debajo del plano del foco existen estructuras desenfocadas cuyos contornos borrosos interfieren seriamente en la imagen obtenida, en particular en la microscopia de fluorescencia.

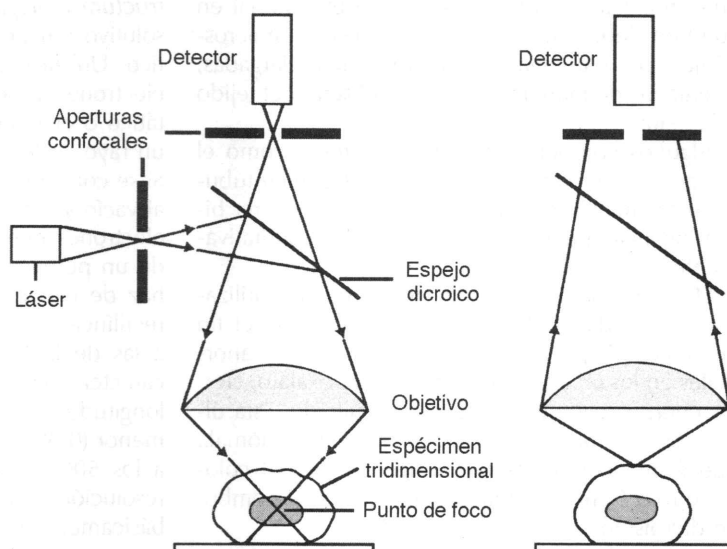
El *microscopio confocal* se utiliza para eliminar directamente las imágenes desenfocadas, lo cual permite obtener un corte o sección óptica de gran definición, que se captura para su análisis digital en computadoras de alta velocidad.

En este microscopio no se ilumina todo el preparado al mismo tiempo, sino que éste es barrido horizontalmente por un delgado haz luminoso, en general por la luz coherente de un láser que atraviesa un orificio diminuto, al tiempo que la platina se mueve perpendicularmente al movimiento del haz, con desplazamientos discretos de gran preci-

sión en relación con cada barrido. Las imágenes de la fluorescencia obtenida sucesivamente en cada uno de los puntos iluminados por el láser durante el barrido deben atravesar una segunda abertura en otra lámina, que está situada confocalmente con la primera. Esto quiere decir que si en el segundo orificio convergen los rayos luminosos de la imagen (esto es, si están en foco), atraviesan la abertura y son recogidos por un detector que transfiere la información a la computadora, para integrarlos en la pantalla de un monitor. Por el contrario, si los rayos provienen de una parte desenfocada del preparado, no convergen en el segundo orificio y son eliminados en su casi totalidad (fig. 3-6).

Además, las imágenes bidimensionales se obtienen y almacenan en forma digital, lo que permite realizar reconstrucciones tridimensionales computarizadas a partir de secciones ópticas sucesivas.

FIG. 3-6. Esquema del principio de funcionamiento del microscopio confocal. Como en otros microscopios de fluorescencia actuales, el preparado es iluminado desde arriba, a través de la óptica del objetivo (epiiluminación). A la izquierda se muestra la marcha de la luz para la parte del tejido situada en el plano focal: la luz del láser atraviesa una diminuta abertura antes de ser desviada por un filtro dicroico para iluminar el espécimen; los rayos de la imagen fluorescente enfocada convergen en la segunda abertura (situada confocalmente) y son recogidos por el sistema fotomultiplicador y analizador digital. A la derecha se ve que las zonas desenfocadas del preparado son eliminadas casi por completo, ya que no consiguen atravesar la abertura confocal.



3-5. La microscopia de polarización permite detectar anisotropía

El *microscopio de polarización* difiere de los convencionales tan solo por el agregado de dos filtros polarizadores de la luz. Uno de ellos (el llamado polarizador) se coloca debajo del condensador, y el otro (el filtro analizador) se coloca por encima de las lentes del objetivo, en general en el tubo del microscopio. Ambos filtros se colocan cruzados, vale decir que los planos de polarización se orientan a 90° uno del otro, con lo cual se suprime el paso de la luz directa. De esta manera el campo microscópico aparece homogéneamente oscuro, salvo ciertos componentes de la preparación que se pueden distinguir brillando sobre un fondo oscuro.

Este método se basa en el comportamiento que tienen esos componentes de la célula y los tejidos ante la luz polarizada. Si el material es isotrópico, la propagación de la luz polarizada ocurre en él con la misma velocidad, cualquiera que sea la dirección del plano de incidencia de aquélla. Estas sustancias o estructuras se caracterizan por tener el mismo índice de refracción en todas las direcciones.

En cambio, en un material anisotrópico la velocidad de propagación de la luz polarizada difiere según la dirección que se considere. Un material con estas características también se denomina birrefringente, porque presenta dos índices de refracción distintos, que corresponden a las diferentes velocidades de transmisión. La luz que emerge de una sustancia birrefringente, luego de atravesarla, se encuentra polarizada en un plano cuya orientación depende de las características del material que compone esa sustancia.

La interpretación biológica de la existencia de anisotropía o birrefringencia es que el material en cuestión debe estar constituido, a nivel submicroscópico, por partículas o macromoléculas alargadas, orientadas de manera paralela en el seno del tejido o la célula.

Algunos componentes extracelulares —como el colágeno— o intracelulares —como los microtúbulos o filamentos citoplasmáticos— poseen una birrefringencia que puede ser expresada cuantitativamente.

El microscopio de polarización puede ser utilizado para el diagnóstico histopatológico, con el fin de detectar la presencia de algunas sustancias anormales en los tejidos, como cristales de oxalato, ciertos cuerpos extraños o sustancia amiloide. Esta última es una proteína fibrilar extracelular anómala que forma complejos birrefringentes con el colorante rojo Congo, propiedad que recibe el nombre de dicroísmo.

3-6. La microscopia de fondo oscuro se basa en la dispersión de la luz a nivel de interfases

Las aplicaciones actuales de este instrumento en el campo de la biología son muy restringidas. En la práctica de laboratorio se lo utiliza a veces para la identificación en fresco de algunos microorganismos de forma característica, como por ejemplo las bacterias del género *Treponema*.

El *microscopio de fondo oscuro*, o *ultramicroscopio*, está basado en el hecho de que la luz se dispersa en los límites entre los diversos materiales que poseen diferentes índices de refracción. El instrumento consiste en un microscopio común en el cual el condensador se reemplaza por otro con el cual se ilumina oblicuamente el objeto. Con el condensador de campo oscuro no entra luz directa en el objetivo, y por lo tanto el objeto aparece brillante, a causa de la dispersión de la luz, sobre un fondo oscuro.

Por medio de este instrumento pueden descubrirse, pero no resolverse, estructuras menores que las que se visualizan con el microscopio común de campo claro.

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Existen dos tipos principales de microscopio electrónico (ME): el *microscopio electrónico de transmisión*, en el cual el preparado está interpuesto en el trayecto electrónico, y el *microscopio electrónico de barrido*, en el que un fino haz de electrones recorre la superficie de la preparación y brinda imágenes de tipo tridimensional.

El microscopio electrónico es el único instrumento que permite conocer directamente la *ultraestructura* biológica, puesto que posee un poder resolutorio mucho mayor que el del microscopio óptico. Utiliza la propiedad que tienen los haces de electrones de ser desviados por un campo electrostático o electromagnético, de la misma forma que un rayo de luz es refractado al atravesar una lente. Si se coloca un filamento de tungsteno en un tubo al vacío y luego se lo calienta, ese filamento emite electrones que pueden ser acelerados por medio de un potencial eléctrico. En estas condiciones, el haz de electrones tiende a seguir una trayectoria rectilínea y presenta algunas propiedades similares a las de la luz. Al igual que ésta, manifiesta un carácter a la vez corpuscular y vibratorio, pero su longitud de onda asociada es hasta 100.000 veces menor (0,005 nm para los electrones, en oposición a los 500 nm de la luz). Dado que el límite de resolución del microscopio electrónico depende básicamente de los mismos factores que en el mi-

microscopio de luz, la disminución de la longitud de onda en el caso de los electrones es la responsable del gran poder discriminatorio del ME. Ciertos factores, sin embargo, como la estrecha apertura numérica impuesta por la gran aberración de las lentes electromagnéticas, fijan los valores corrientes del límite de resolución para este instrumento en alrededor de 0,3 nm.

El filamento de tungsteno (o cátodo) del microscopio electrónico emite una corriente de electrones que actúa como una fuente termiónica. Por medio de una bobina electromagnética, que hace las funciones de condensador, los electrones se concentran en el plano donde se coloca el objeto. La segunda bobina funciona como una lente objetivo y da una imagen agrandada del objeto. Esta es recibida por una tercera lente electromagnética que actúa como ocular o lente de proyección, que aumenta la imagen que proviene del objetivo. La imagen final se ve sobre una pantalla fluorescente y eventualmente se registra sobre una placa fotográfica (fig. 3-7). Una cámara de televisión acoplada puede recoger también la imagen y transferirla a un monitor, a una impresora de video o a un analizador digital de imágenes.

En el microscopio electrónico el límite de resolución es tan bajo que la imagen final puede ampliarse mucho más que en el microscopio óptico. En este último, el aumento se debe principalmente al objetivo, que llega a un máximo de 100 a 120 $\times$. El ocular incrementa esta imagen entre 5 y 15 veces, con lo que se llega a una magnificación útil de 500 a 1.500 $\times$. En el ME la imagen inicial del objetivo, que puede ser de 100 $\times$, se puede ampliar en forma útil 200 veces con la bobina proyectora, lo que equivale a un aumento total de 20.000 $\times$.

Con la introducción de lentes intermedias se obtiene un amplio grado de aumentos, lo que permite lograr magnificaciones directas que alcanzan hasta 1.000.000 $\times$, mientras que los negativos pueden ampliarse fotográficamente hasta 10.000.000 $\times$ o más, según la resolución alcanzada.

A pesar de las aparentes semejanzas, existen grandes diferencias entre el microscopio óptico y el ME, algunas de las cuales se refieren al mecanismo de formación de la imagen.

En el microscopio electrónico la imagen se debe principalmente a la dispersión de los electrones. A menudo, los electrones que se aproximan a los átomos del objeto son desviados por éstos, ya sea porque son repelidos por las nubes de electrones, atraídos por la carga positiva de los núcleos atómicos, o porque son dispersados en forma elástica o inelástica por colisiones atómicas. La imagen observada en la pantalla fluorescente es el resultado de la ausencia de esos electrones, que fueron detenidos por caer fuera de la abertura de la lente obje-

tivo o por haber perdido gran parte de su energía en las colisiones. La dispersión de electrones depende del espesor y la densidad molecular del objeto, y en especial del número atómico de los átomos que entran en su composición. A mayor número atómico, mayor dispersión. Gran parte de los átomos que componen las estructuras biológicas son de bajo número atómico (como el hidrógeno, el carbono, el oxígeno, el nitrógeno y el fósforo, entre otros) y contribuyen poco a la formación de la imagen.

Por esta razón se deben agregar átomos pesados a la estructura molecular para aumentar el contraste. Generalmente los tejidos se refijan en tetróxido de osmio y luego se impregnan con sales de plomo y de uranio, que actúan como "colorantes" electrónicos, comparables con los colorantes histológicos, al combinarse selectivamente con determinadas regiones del espécimen.

Otra diferencia con el microscopio óptico es que el ME tiene mayor profundidad de foco, lo que se ha usado para desarrollar la microscopia electrónica tridimensional de cristales de proteínas y hasta organoides celulares, como los ribosomas. Esta propiedad es especialmente importante en el microscopio electrónico de barrido.

3-7. El material biológico para el MET debe ser extremadamente fino

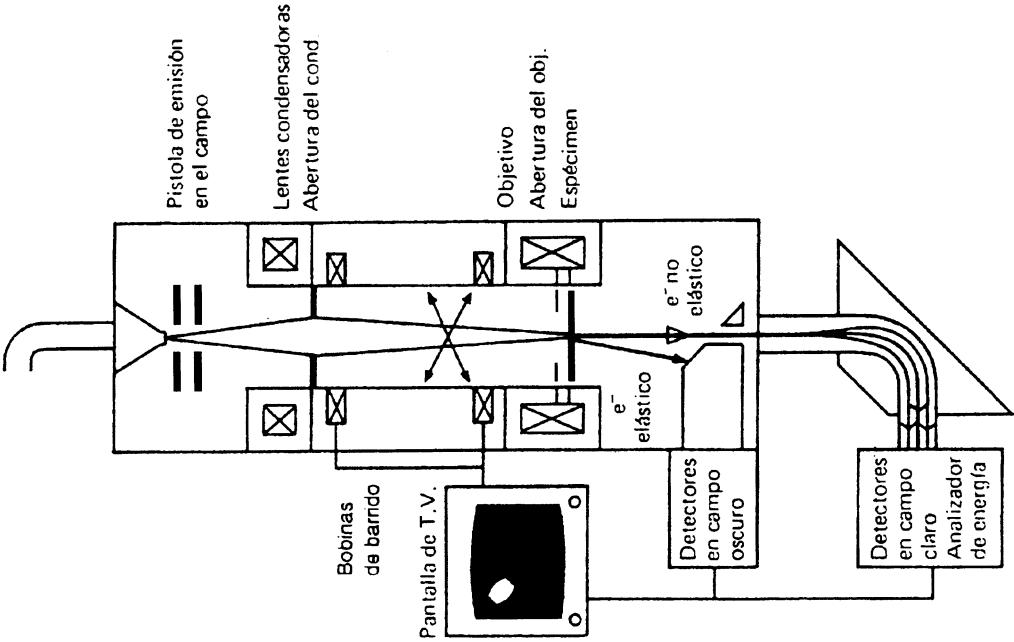
Una de las limitaciones del MET se debe al escaso poder de penetración de los electrones en los instrumentos comunes. Si el espesor del material excede los 500 nm, la opacidad es casi total. Por lo común, el espécimen se deposita sobre una película extremadamente fina (de 7,5 a 15 nm de espesor) de colodión, carbón, etc., que actúa como material de sostén y que a su vez está apoyada sobre una fina grilla de metal. Otra limitación deriva del hecho de que el preparado debe estar deshidratado para ser colocado en el vacío del instrumento, aunque recientemente se desarrollaron, para algunos modelos de microscopios, portaespecímenes refrigerados con nitrógeno líquido que permiten la observación de material hidratado.

3-8. Para los cortes finos se usan resinas epoxi y ultramicrotomos

La necesidad de realizar cortes ultrafinos del material ha conducido al empleo de medios de inclusión de considerable dureza. Los más usados son las *resinas epoxi*, que impregnan los tejidos luego de deshidratados, y posteriormente son polimerizadas por medio de catalizadores apropiados.

Recientemente se han elaborado resinas miscibles en agua que pueden ser infiltradas y polimeri-

MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO



MICROSCOPIO ELECTRONICO CONVENCIONAL

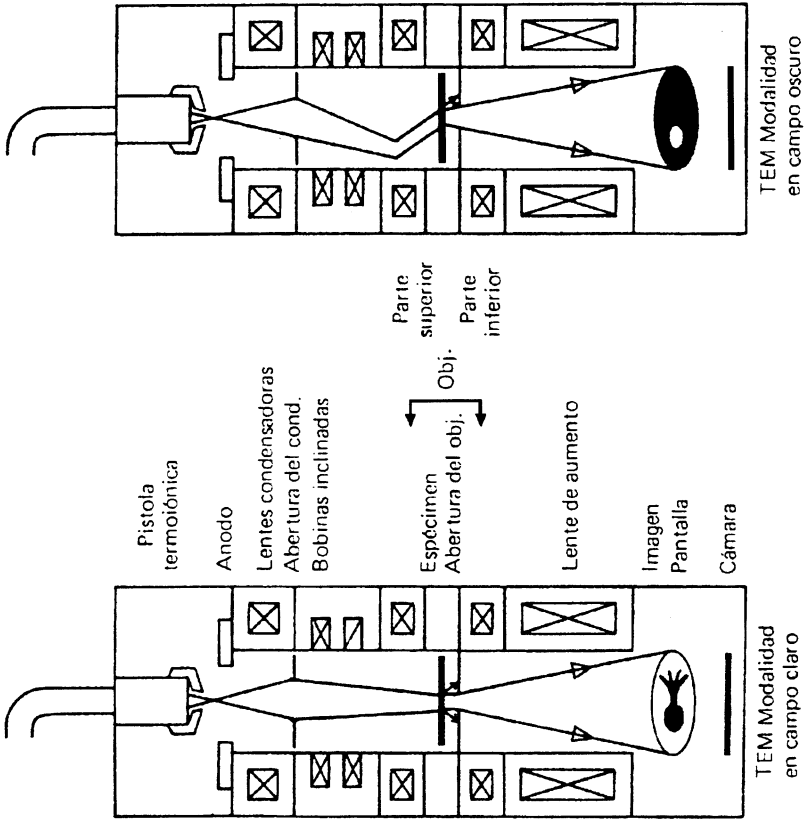


Fig. 3-7. Dibujo que muestra los principios básicos del microscopio electrónico convencional (TEM), en sus modalidades de campo claro y de campo oscuro, y del microscopio electrónico de barrido (SEM). (Cortés de E. Kellenberger.)

zadas a -35 o -50° . Dicho método de inclusión reduce los artificios y permite el empleo de métodos citoquímicos en el corte.

Para preparar cortes extremadamente finos se construyeron diversos *ultramicrotomos* que presentan un avance térmico o mecánico. Con ambos tipos, los cortes más finos que pueden lograrse tienen unos 20 nm de espesor (aproximadamente la centésima parte de lo que se obtiene en los mejores preparados de microscopio óptico). Los factores que influyen aparentemente en la limitación del espesor son la inclusión apropiada y el filo de la cuchilla, que generalmente es de vidrio o de diamante. Es posible asimismo realizar cortes ultrafinos a baja temperatura en material incluido simplemente en gelatina.

3-9. La microscopia electrónica de alto voltaje permite el estudio de especímenes más gruesos

La mayoría de los microscopios electrónicos usan un voltaje de aceleración de 50 a 100 kilovoltios; sin embargo, hay actualmente instrumentos cuya aceleración es mucho mayor (500 a 3.000 kV). Estos *microscopios de alto voltaje* son esencialmente similares a los ya descritos, pero de mayor tamaño para permitir la alta aceleración, un campo magnético más grande para las lentes y el blindaje indispensable para proteger al operador. Se usan especialmente en metalurgia, pero se pueden aplicar al estudio de especímenes biológicos. La ventaja consiste en que permiten examinar cortes más gruesos (hasta 5.000 nm) y células enteras, y en que el daño producido por la irradiación es menor. Este instrumento posibilita, en teoría, la observación de células vivas dentro de cámaras especiales. También se puede obtener una información mayor mediante fotografías estereoscópicas (fig. 1-11).

3-10. El MET permite examinar partículas extendidas

Un importante método para el estudio de las macromoléculas es la denominada *técnica de las monocapas* de Kleinschmidt, en la cual las macromoléculas se extienden sobre una interfase aire-agua antes de ser recogidas sobre una película. Este procedimiento ha dado excelentes resultados en la demostración de moléculas de ADN y ARN de distintos orígenes y tipos (fig. 3-8).

Una técnica parecida, basada en la acción disruptiva de una interfase aire-agua, se usa para estudiar la estructura de cromosomas meióticos. Otro método para el estudio de macromoléculas, como el ADN y el ARN, es el elaborado por Miller y basado en la centrifugación, a través de medios apropiados, directamente sobre una película de

sostén. Esta técnica proporciona al investigador una herramienta importante para observar pequeñísimos cambios en la molécula de ADN y seguir, a nivel molecular, los procesos de transcripción y traducción. En los capítulos correspondientes se ofrecen numerosas ilustraciones.

3-11. El contraste de las estructuras extendidas se puede aumentar por el método del sombreado metálico o por coloración negativa

La técnica denominada de *sombreado* consiste en colocar el espécimen entero (virus, macromoléculas, fibrillas, etc.) dentro de una cámara de vacío y en evaporar metales pesados como cromo, platino, paladio o uranio, depositándolos en un ángulo determinado, a partir de un filamento incandescente. De esa manera, el material se deposita sobre un lado de la superficie del espécimen, mientras que del otro lado se produce una sombra cuya longitud permite calcular el espesor de esas partículas. Las microfotografías de estos elementos presentan un aspecto tridimensional que normalmente no se observa (fig. 3-8).

Una técnica importante en el estudio de los virus y macromoléculas es la de la *coloración negativa*, en la cual el espécimen es embebido en unas gotas de material electrodensito como el fosfotungstato. Este material penetra en todos los espacios densos que existen entre las macromoléculas o partículas, las que aparecen muy bien delimitadas como estructuras claras en contraste negativo (fig. 1-4).

3-12. Una réplica de las membranas celulares se puede estudiar mediante el MET

El estudio de la ultraestructura de las membranas biológicas se vio facilitado de modo considerable con el empleo de técnicas de *congelación* y *fractura* de las células. En general, esta técnica se basa en el congelamiento rápido del tejido en nitrógeno líquido, su fractura mediante el golpe de una navaja enfriada, y cierto grado de sublimación del agua en el vacío (grabado). Este proceso, que supone el paso directo del hielo a vapor, proporciona una visión tridimensional de la estructura. El objeto del grabado es, de tal modo, dejar al descubierto y hacer visibles los finos detalles de la superficie.

Como se ilustra en la figura 3-9, después de esto se efectúa el depósito de una delgadísima capa de metal evaporado (por ejemplo, platino) formando un ángulo, como en el método del sombreado antes descrito. El metal, reforzado por una capa de carbono depositado también por evaporación (pero en ángulo de 90°), se desprende de la muestra. Esta es la denominada réplica del objeto, que entonces se monta en la grilla del microscopio electrónico de transmisión para su observación.

Este método de la *congelación-fractura y réplica* proporciona una representación de aspecto natural de la superficie de los objetos (fig. 3-9) y permitió importantes descubrimientos sobre la estructura molecular de diferentes tipos de membranas biológicas. La fractura puede mostrar la superficie interna o externa de una membrana, pero en general separa ambas mitades de las membranas por su parte media; revela así información acerca de los componentes que pasan por la bicapa lipídica o que se encuentran en una u otra capa (fig. 4-13). De esta manera se puede obtener una réplica tridimensional en cierto modo semejante a las obtenidas con el microscopio electrónico de barrido, pero con mayor resolución.

Más detalles sobre el método de congelación-fractura, grabado y réplica, así como sobre la nomenclatura utilizada en las membranas separadas, se encontrarán en el capítulo 4.

3-13. El microscopio electrónico de barrido permite obtener imágenes tridimensionales

Con el *microscopio electrónico de barrido* (scanning) se puede obtener una vista superficial del preparado, aprovechando la emisión secundaria de electrones que se produce cuando un haz de electrones primarios ha interactuado con la superficie de un espécimen entero (fig. 3-10).

En este caso, un delgado haz de electrones se mueve en vaivén, barriendo la superficie del espécimen, de la misma manera que lo hace en un tubo de televisión. Los electrones secundarios son recogidos entonces por un tubo fotomultiplicador y la imagen aparece en una pantalla de televisión. Para aumentar el poder dispersante de las estructuras superficiales suele recurrirse al revestimiento de la superficie o a la infiltración con sustancias químicas de contraste electrónico.

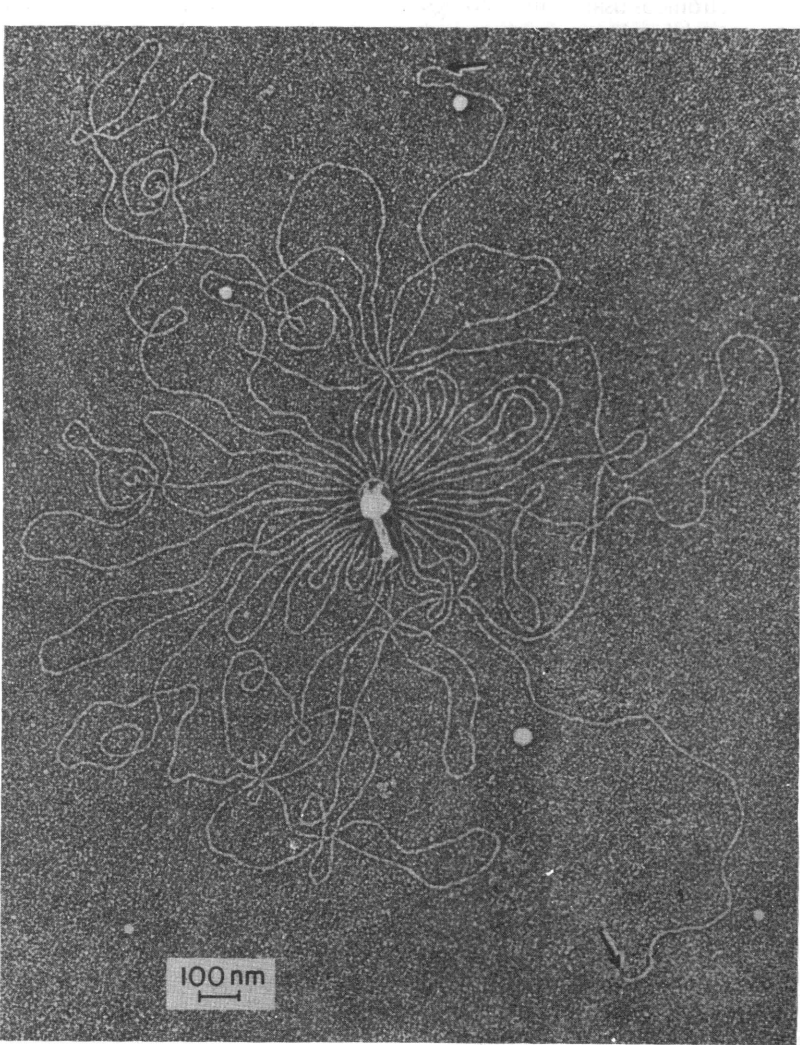


FIG. 3-8. Microfotografía electrónica de un bacteriófago (en el centro) que ha experimentado un shock osmótico. La molécula de ADN que se hallaba contenida en la "cabeza" del bacteriófago ahora está dispersa. Se indican con flechas los extremos de la única molécula no ramificada de ADN. Preparación sombreada con platino. 76.000x. (Cortesía de A. K. Kleinschmidt.)

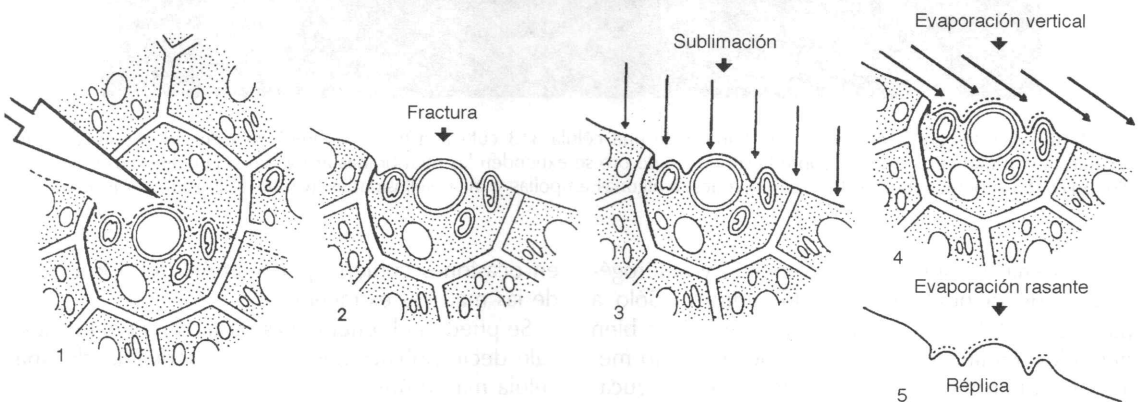
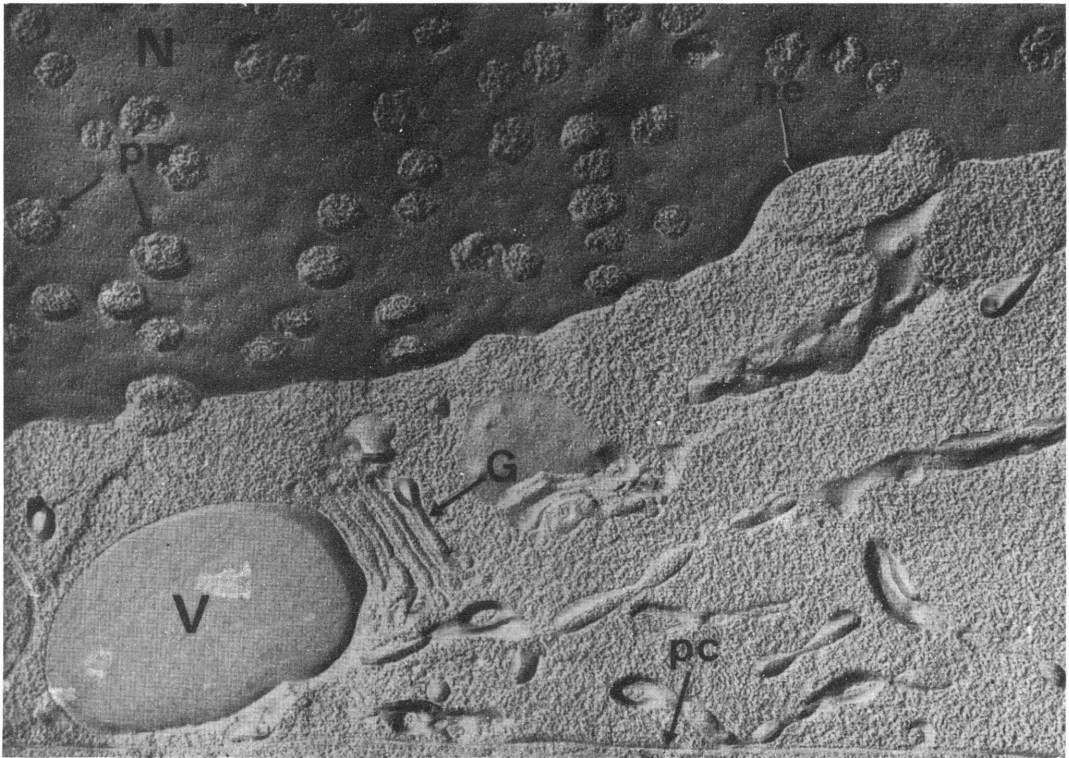


FIG. 3-9. Microfotografía electrónica de transmisión (75.000x) de una célula de cebolla preparada con el método de congelación-fractura, grabado y réplica. La parte superior de la figura corresponde a la superficie del núcleo (N) con numerosos poros (pn) y los límites de la envoltura nuclear (ne). En el citoplasma pueden observarse un dictiosoma (G) y una gran vacuola (V), así como algunos perfiles de cisternas del retículo endoplasmático (RE). La pared celular se señala como pc. *Abajo:* esquema del método de preparación. En 1, el tejido congelado es fracturado por un golpe de navaja; en 2 queda expuesto un plano de fractura, parte de cuyo contenido acuoso puede sublimarse al vacío (grabado); en 3 se cubre la superficie con carbono a 90°; en 4 se cubre la superficie con platino formando un ángulo; en 5 se extrae la réplica, o molde de la superficie, y se observa con el microscopio electrónico.

CULTIVO DE TEJIDOS

Uno de los principales métodos para estudiar la célula viva es el empleo de cultivos celulares. Desde que en 1912 A. Carrel pudo hacer crecer explantes de tejidos durante varias generaciones, la técnica de cultivo de tejidos progresó notablemen-

te. En la actualidad es uno de los métodos más utilizados para encarar problemas fundamentales de la biología celular. En los primeros tiempos la técnica consistía en hacer un explante de un pequeño trozo de un tejido, de preferencia embrionario, y cultivarlo en un medio formado por suero sanguíneo, extracto embrionario y solución salina.

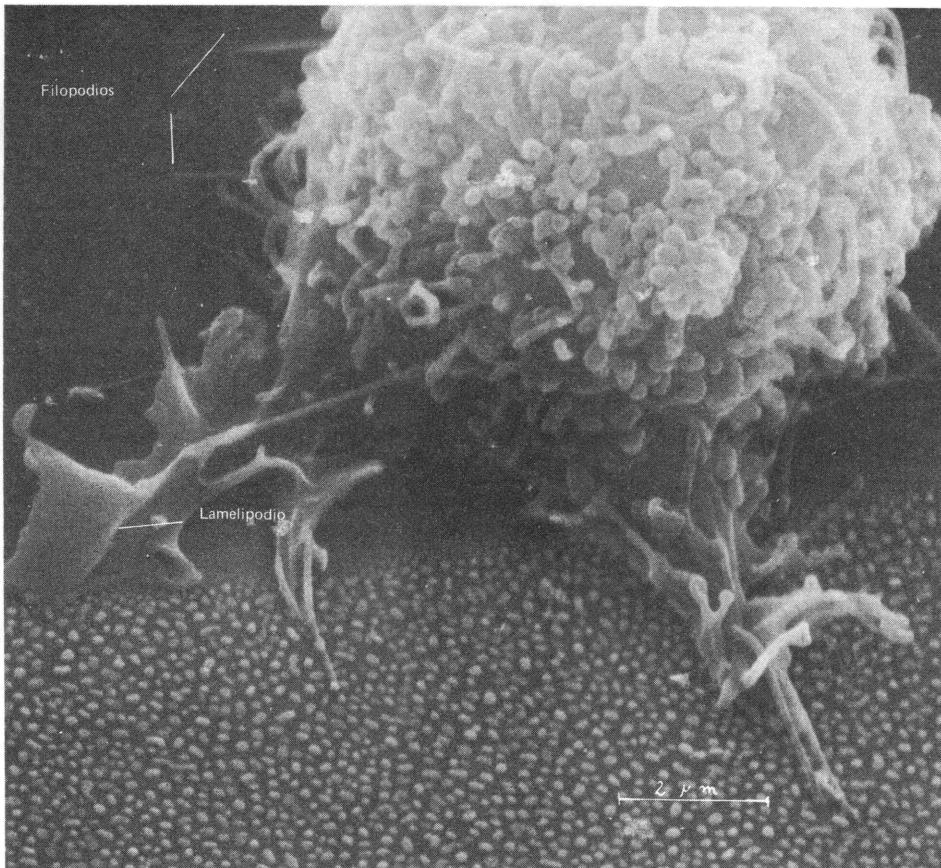


FIG. 3-10. Microfotografía electrónica de barrido de una célula 3T3 cultivada en un cubreobjetos de vidrio parcialmente recubierto con partículas de oro. Sobre la superficie de oro se extienden las membranas arrugadas o lamelipodios y algunos filopodios. La superficie dorsal de la célula muestra algunas ampollas y microvellosidades. (Cortesía de Albrecht-Bühler.)

Este sistema era sumamente complejo y heterogéneo desde el punto de vista bioquímico. Sólo a partir de 1955 se idearon medios químicos bien definidos. En la actualidad se conocen mucho mejor los requerimientos nutricios de las células eucariotas, las cuales pueden crecer en un medio sintético con el agregado de una pequeña cantidad de suero, el que les provee fundamentalmente factores de crecimiento (véase cap. 16).

Se distinguen tres tipos principales de cultivos: primarios, secundarios y de líneas establecidas.

Los *cultivos primarios* se obtienen directamente de los tejidos vegetales o animales. El tejido se separa en condiciones de asepsia, se corta en trocitos pequeños y se obtiene una suspensión de células libres tratándolo con tripsina o con quelantes del calcio. A las células libres se las sumerge entonces en medios de cultivo apropiados. A diferencia de las bacterias, las células eucariotas no son capaces de reproducirse en un medio líquido, por lo que requieren de un soporte adecuado, en general el vidrio o plástico de una cápsula de Petri,

en ocasiones cubierto por material del tipo de los de las matrices extracelulares.

Se pueden obtener cepas puras o monoclonales, vale decir, poblaciones celulares derivadas de una célula madre única.

Un *cultivo secundario* se obtiene por el tripsinado de uno primario y su nuevo cultivo (o subcultivo) en otra cápsula de Petri.

Pese a la creencia inicial de que las células normales eran capaces de crecer y dividirse indefinidamente en cultivos, éstas no sobreviven muchas generaciones, y al cabo de varios subcultivos tienden a dejar de dividirse y mueren. Por ejemplo, los fibroblastos embrionarios humanos poseen un número fijo de divisiones mitóticas —aproximadamente 50— más allá de las cuales envejecen y mueren. En caso de que los fibroblastos provengan de un adulto, el número de divisiones posibles es aún menor.

Estas limitaciones se comprobaron en todas las células humanas cultivadas hasta la fecha, sin que haya sido posible establecer con certeza las causas

de esta senescencia. Se sabe, sin embargo, que la expresión de ciertos genes cambia sistemáticamente a medida que las células en cultivo van perdiendo su capacidad de división, como si existiera un programa génico para el envejecimiento celular. Uno de los cambios observados es la inactivación del gen *c-fos*, lo cual interfiere en los mecanismos de replicación del ADN. La longitud de los telómeros, por otra parte, va disminuyendo paulatinamente en cada división celular. La longitud de los telómeros es el elemento que permite predecir mejor cuál es la capacidad potencial de proliferación.

En raras ocasiones, como consecuencia de cambios génicos, algunas células sobreviven e inician un cultivo permanente de líneas establecidas.

Los *cultivos de líneas celulares establecidas* son muy corrientes. En ellos las células se han adaptado a un crecimiento prolongado *in vitro*, generalmente por una transformación de tipo tumoral. Entre las mejor conocidas se encuentran las células HeLa, obtenidas de un carcinoma pavimentoso cervical humano, los fibroblastos 3T3 del ratón, los fibroblastos BHK del riñón del hámster recién nacido, los mioblastos L de rata o las células CHO del ovario de rata.

Las líneas celulares establecidas tienen características distintas: crecen en forma más apretada, necesitan menor concentración de suero sanguíneo y en general son heteroploides, es decir que el número de cromosomas varía de una célula a otra. A pesar de estas anomalías, son muy útiles como modelo para el estudio del cáncer y de múltiples procesos bioquímicos y estructurales.

3-14. La micromanipulación celular se basa en el empleo de microinstrumentos para estudiar las diversas estructuras orgánicas

Además del cultivo de tejidos, otro método que ha contribuido considerablemente al conocimiento de la célula viva es el de la *micromanipulación o microcirugía*. El método se basa en la introducción en células y tejidos de micropipetas, microagujas, microelectrodos, microtermocuplas, etc., con ayuda de aparatos especiales (micromanipuladores) que permiten el movimiento controlado de estos instrumentos bajo el campo del microscopio. Con este instrumental se efectúa: 1) la disección y extracción de partes de células y tejidos; 2) la inyección de sustancias; 3) la medición de variables eléctricas; 4) el injerto de partes de una célula en otra, y así sucesivamente.

Con esta metodología, por ejemplo, se puede sellar el extremo de una micropipeta con un parche de membrana succionada de la superficie celular (técnica del *pinzamiento de membrana* o *patch clamp*), de fundamental importancia para el estudio

de los mecanismos de transporte de membrana, de receptores, etcétera.

El empleo de finos haces de luz coherente proveniente de láseres se puede utilizar de dos maneras: para destruir selectivamente ciertos componentes celulares o para desplazar por atracción fotónica a elementos celulares diminutos ("pinzas" o "trampas" ópticas).

CITOMETRIA DE FLUJO

Se han elaborado métodos para seleccionar células enteras de un determinado tipo a partir de una muestra heterogénea, o bien partes de ellas (como ciertos tipos de cromosomas). Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante el uso de cámaras de sedimentación especiales, que funcionan con baja gravedad, en las que se separan las células por su tamaño y densidad. Otros métodos recurren a las propiedades de adhesión diferencial de ciertas células a materiales como plástico, vidrio o matrices artificiales, con recubrimiento de inmunoglobulinas para condicionar esa adhesividad o sin él.

Más útil todavía resultó la introducción del *seleccionador de células* electrónico (*cell sorter*) o *citómetro*, que en la actualidad tiene múltiples aplicaciones en investigación, diagnóstico oncológico, inmunológico, etcétera.

El primer paso de este método consiste en separar a las células de su asociación con otras células o con las matrices, para lo cual se recurre a enzimas proteolíticas del tipo de la tripsina o a agentes sequestradores del calcio (como se verá en el capítulo 6-4, la integridad de las uniones intercelulares adhesivas depende del calcio).

Luego se pueden marcar determinadas células o partículas con anticuerpos unidos a colorantes fluorescentes. Las células fluorescentes pueden ser separadas de las que no lo son con el *seleccionador de células activado por fluorescencia*, que detecta por medio de un fino haz de láser la fluorescencia de cada una de las células.

Con las células así obtenidas es posible iniciar cultivos celulares, determinar la fracción marcada sobre el total celular o efectuar diversos estudios morfológicos, biológicos o moleculares sobre ambas poblaciones.

PREPARACION DE TEJIDOS PARA EL ESTUDIO MICROSCOPICO

Como ya vimos en la sección correspondiente de este mismo capítulo, las células y tejidos son examinados por transparencia con todos los tipos de microscopios, con la principal excepción del mi-

croscopio electrónico de barrido, lo que obliga a estudiar células aplanadas o láminas tisulares lo suficientemente delgadas como para que puedan ser atravesadas por la radiación luminosa. Esto implica una serie de procedimientos que culminan con la obtención de un fino corte transparente del tejido.

3-15. La fijación es el primer paso de la técnica histológica

La fijación es esencialmente un método para la preservación de la morfología y la composición química de la célula y los tejidos. Consiste en matar a las células, de manera tal que las estructuras que poseían éstas en el estado viviente se conserven con un mínimo de artificios a lo largo del tiempo y durante los procedimientos posteriores de preparación del tejido para su observación microscópica. Al mismo tiempo, algunos métodos tratan de mantener intacta su composición química.

La fijación debe realizarse inmediatamente después de extraer las células del organismo, de modo de evitar las lesiones agónicas producidas por la anoxia, que provocan inicialmente cambios osmóticos y luego alteraciones estructurales y bioquímicas más profundas. Por el mismo motivo, los fijadores deben actuar sobre fragmentos relativamente pequeños de tejido, de modo que la difusión del fijador desde las superficies hasta la parte central del bloque tisular se haga en un tiempo reducido. En este sentido, la velocidad de difusión del fijador debe ser lo más alta posible, y es característica de cada uno de ellos.

La elección del fijador adecuado está dictada por el propósito que se persigue. Para el diagnóstico histopatológico corriente es de uso universal el formol. En ocasiones se utilizan mezclas de fijadores.

Para el estudio de la cromatina y los cromosomas se emplean con frecuencia los fijadores ácidos (generalmente ácido acético), y para el estudio de la actividad enzimática se usan la acetona, el glutaraldehído o el formaldehído, que producen una mínima desnaturalización y preservan muchos sistemas enzimáticos.

Para la microscopia electrónica se emplea casi invariablemente la fijación con glutaraldehído, seguida por la refijación con tetróxido de osmio, en ambos casos controlando cuidadosamente la osmolaridad y el pH de las soluciones fijadoras.

Algunos agentes fijadores como el formol, el glutaraldehído, el bicromato y el bicloruro de mercurio dan lugar a fuertes uniones entre moléculas proteicas. Por ejemplo, el formaldehído reacciona con los grupos amino, carboxilo e indol de las proteínas, y produce entonces uniones de metileno con otras moléculas proteicas. En el glutaraldehído hay dos grupos aldehído que pueden reaccionar con grupos

amino situados en dos moléculas de proteínas adyacentes.

El grado de organización en el nivel macromolecular es de gran importancia para la conservación de la estructura por la fijación. En una estructura bien organizada, como los cromosomas, mitocondrias, cloroplastos, etc., existe un gran número de fuerzas que interactúan manteniendo a las moléculas unidas, a causa de lo cual la acción del fijador es suficiente para mantener las relaciones estructurales sin mayores alteraciones. Sin embargo, en regiones menos organizadas, como en el caso de la matriz citoplasmática, la preservación se torna más dificultosa y es más probable la producción de artificios de fijación, como retracción, precipitación de componentes, etcétera.

3-16. Los métodos de congelación-desección y de congelación-sustitución preservan la composición química

No son, estrictamente, métodos de fijación, pero en ciertos casos pueden usarse para reemplazarlos.

El método de *congelación y desecación* consiste en la congelación casi instantánea del tejido y en su deshidratación en el vacío a alta temperatura. La fase inicial de congelación comienza con la introducción de pequeñas piezas del tejido en un baño de isopentano, refrigerado por nitrógeno líquido a una temperatura de -160 a -190°C . Se empleó también helio líquido a una temperatura cercana al cero absoluto (Kelvin). La desecación se realiza en el vacío a -30 a -40°C . En estas condiciones, el hielo de los tejidos sublima y pasa directamente al estado gaseoso, con lo que se produce la deshidratación.

Las ventajas de este método son obvias. No causa retracción del tejido; la preservación es homogénea en todo el espesor de la pieza; no hay extracción de sustancias solubles; la composición química se mantiene prácticamente sin cambios, y la estructura, por lo general, se conserva con las muy escasas modificaciones producidas por los cristales de hielo (fig. 3-11), que son menores cuanto más rápida haya sido la congelación. La rapidez del congelamiento permite también sorprender a las células en momentos críticos de su función, como en la exocitosis de vesículas secretorias.

Los tejidos deshidratados pueden luego ser impregnados —directamente o después de una fijación con vapores de aldehídos o de osmio— con materiales de inclusión como la parafina, el meta-crilato o las resinas epoxi para efectuar cortes histológicos.

En el método de la *congelación-sustitución*, después de una rápida congelación el tejido se mantiene congelado a baja temperatura (-20 a -60°C)

en un reactivo que disuelve los cristales de hielo (etanol, metanol, acetona). Las ventajas son similares a las antedichas.

En biología también se utiliza el método de la *congelación rápida*, en ocasiones con el empleo de crioprotectores, no como método de preparación de las células para su estudio, sino simplemente para su conservación y utilización posterior. Por ejemplo, se pueden almacenar células cultivadas para su posterior recuperación y preparación de placas. Su empleo es generalizado en los bancos de semen (en medicina o en veterinaria) con fines de inseminación artificial, así como en el caso de ovocitos o incluso de embriones congelados.

3-17. Los cortes histológicos brindan láminas tisulares transparentes

Para posibilitar su observación con el microscopio, como ya vimos, los tejidos deben ser cortados en láminas delgadas. Con la excepción principal del *vibrátomo*, que es un aparato provisto de una hoja vibratoria que posibilita el corte de tejidos frescos para algunos estudios citoquímicos, los instrumentos utilizados para la obtención de cortes son los *micrótomos*. Con el fin de obtener cortes finos es un requisito indispensable que el tejido haya sido previamente endurecido: cuanto mayor sea la firmeza del tejido, tanto más delgado resulta el corte

histológico. Existen dos métodos principales para endurecer los tejidos: la congelación y la inclusión.

Los *micrótomos de congelación* son utilizados diariamente en los quirófanos para el diagnóstico inmediato de muestras de tejidos, mientras el paciente permanece aún anestesiado. En estas *biopsias por congelación*, en que la rapidez del diagnóstico histopatológico es esencial para determinar la conducta quirúrgica, se utilizan por lo general micrótomos de congelación refrigerados por la expansión de dióxido de carbono líquido. La calidad de los preparados es apenas aceptable, pero más que suficiente para los fines diagnósticos.

Con instrumentos compuestos por un micrótomo incluido en una cámara de baja temperatura —el denominado *crióstato*—, pueden efectuarse cortes de calidad algo superior de tejido fresco o fijado con fines citoquímicos (fig. 3-12).

Para las técnicas de corte de uso más frecuente se emplea el *método de inclusión*. En este caso el procedimiento es más lento, pero la calidad de los preparados es muy superior. El tejido se impregna (o incluye) en un material que le confiere una consistencia adecuada para el corte con el micrótomo. En general, para los cortes que deben observarse con el microscopio óptico se usa la *parafina*. Dado que ésta es una sustancia hidrofóbica, sólida a temperatura ambiente, el tejido fijado debe ser deshidratado en alcoholes, transferido a un solvente

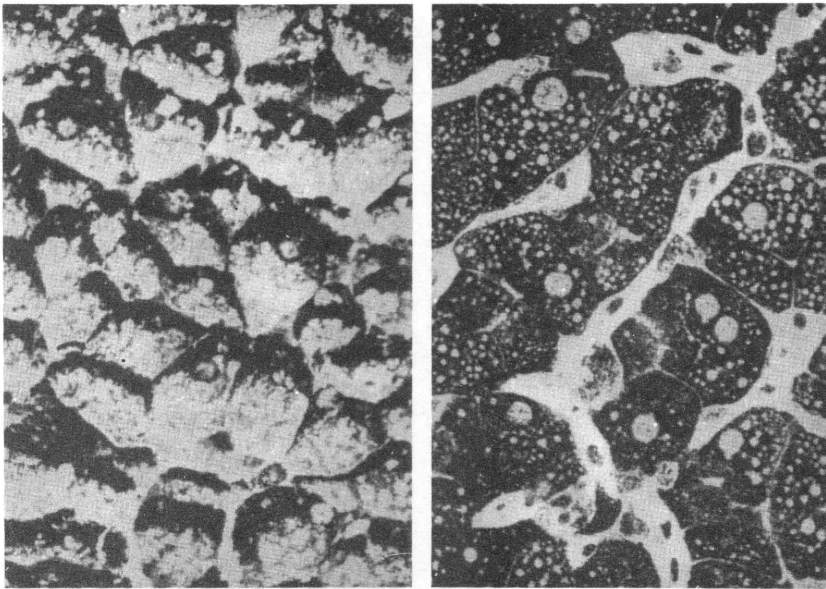


FIG. 3-11. Izquierda, células hepáticas de *Amblystoma* fijadas en Zenker-formol. La corriente de difusión producida por el fijador químico (desde la parte inferior de la figura a la superior) desplaza al glucógeno de las células. Coloración: carmín de Best. Derecha, células hepáticas de *Amblystoma* fijadas por congelación y desecación. El glucógeno aparece distribuido en forma homogénea en el citoplasma. Se destacan los núcleos y las gotas de grasa de forma esférica. Coloración: carmín de Best. (Preparados del Dr. I. Gersh.)

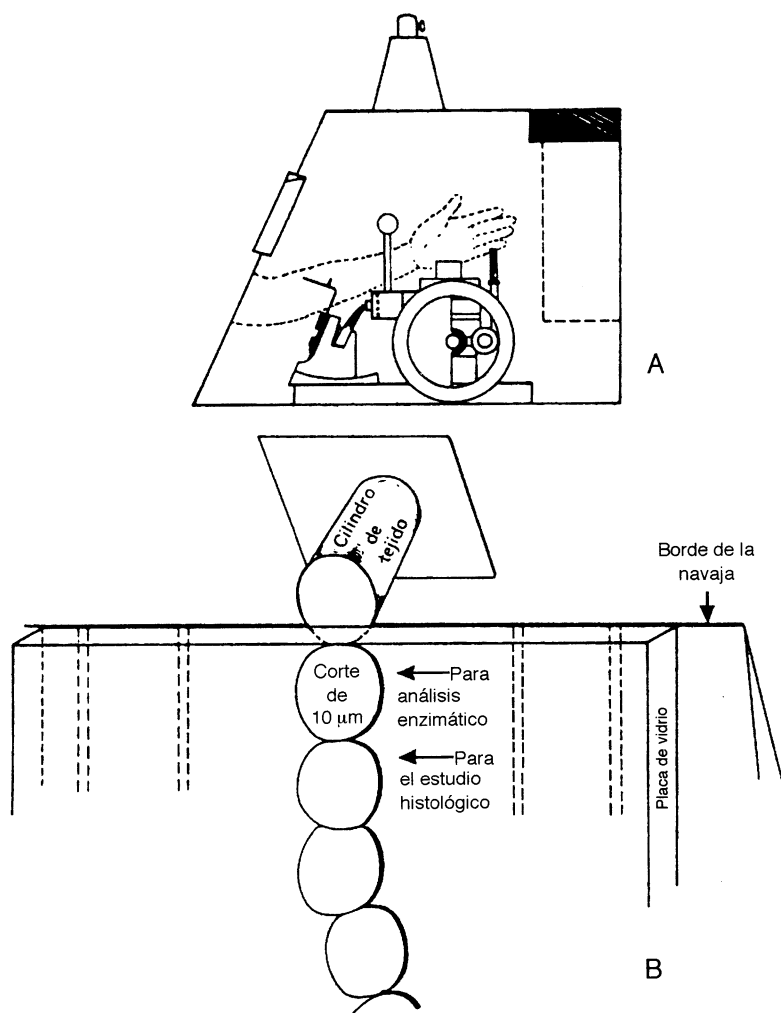


FIG. 3-12. A. Micrótomó para cortes de congelación. El aparato se halla en una caja especialmente refrigerada que mantiene congelados el tejido y los cortes. B. Esquema de la sección de los cortes con el micrótomó de congelación. El cilindro de tejido es seccionado y los cortes se recogen alternadamente para el análisis enzimático y el control histológico. (De Linderström-Lang.)

intermediario (o agente "aclaramiento") como el benceno o el tolueno (ya que el alcohol no es miscible en parafina) y luego colocado en un recipiente con parafina fundida a 56°C en el calor de una estufa. Después de impregnar el tejido, se deja solidificar la parafina con el tejido incluido y se efectúan los cortes con el micrótomó.

En ocasiones el tejido se impregna con metacrilatos de bajo peso molecular, lo cual permite obtener cortes más delgados.

Para la microscopia electrónica la inclusión se realiza casi invariablemente en *resina epoxi*, y los bloques resultantes, de gran dureza, son seccionados por la navaja de diamante o de vidrio del *ultramicrotomo*, como ya vimos.

3-18. La coloración permite contrastar entre sí diferentes estructuras

La obtención de cortes delgados soluciona uno de los inconvenientes de la observación microscó-

pica, pero hace evidente otro de ellos: posibilita que los cortes sean transparentes, aun cuando la falta de colores y contrastes en las estructuras celulares no permite visualizar casi ningún componente.

Al referirnos a los microscopios de fases y de Nomarski vimos que son útiles para aumentar artificialmente el contraste de preparaciones, pero se obtienen resultados muy superiores mediante la coloración de los tejidos. Por tal motivo, el empleo de aquellos microscopios queda restringido prácticamente al estudio de células vivas.

La *tinción* o *coloración* se efectúa con dos propósitos. En un caso se trata de posibilitar el estudio morfológico o estructural, sin que se pueda obtener mayor información sobre la naturaleza química de las estructuras observadas. En el otro se utilizan métodos tendientes a identificar un determinado tipo de molécula o sustancia, visualizándola microscópicamente. En este caso se habla de tinciones o reacciones *citoquímicas* o *histoquímicas*, que trataremos más adelante en este capítulo.

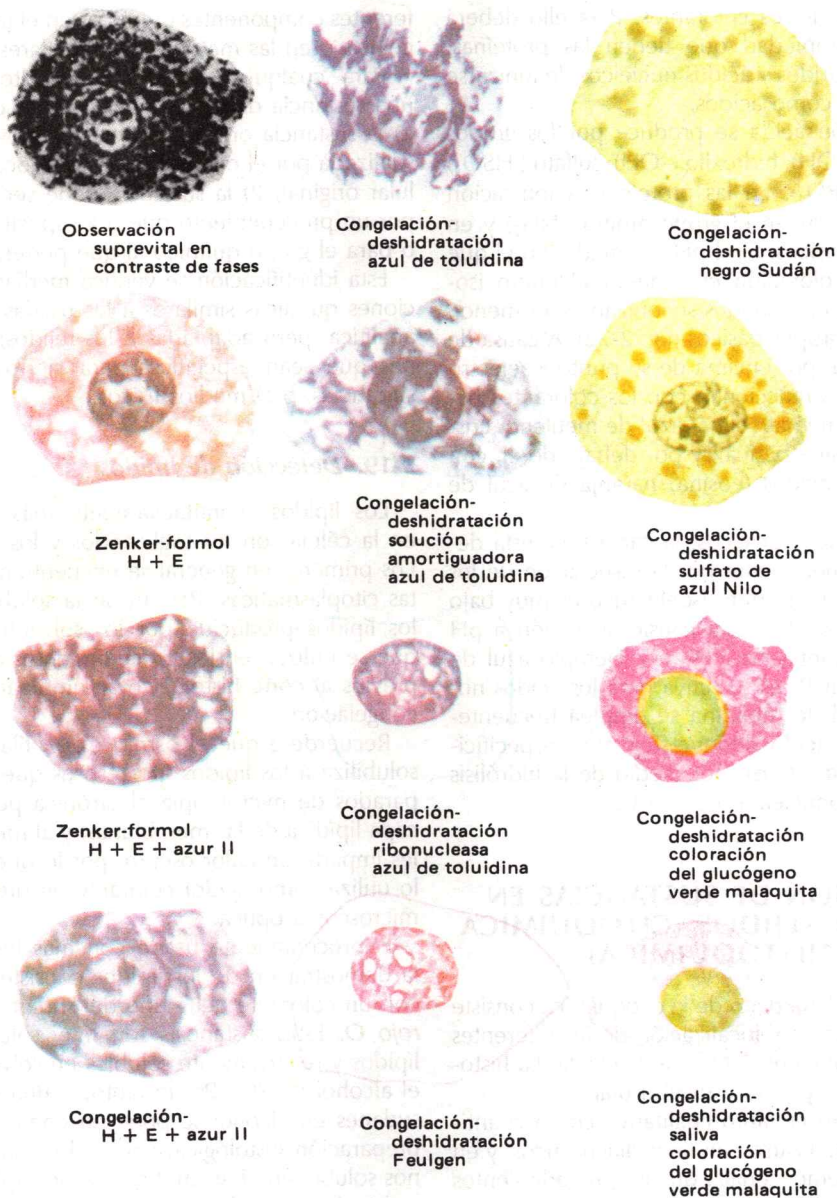


FIG. 3-13. Células de hígado de ratón fijadas y coloreadas por una variedad de procedimientos citoquímicos que evidencian la distribución del ácido desoxirribonucleico, el ácido ribonucleico, el glucógeno y gotas de lípidos. Como estos métodos fueron aplicados a materiales fijados por congelación y desecación, algunos de los cortes se compararon con otros fijados en Zenker-formol. Para una mejor orientación, se agregó también una célula coloreada con hematoxilina y eosina y una célula, no fijada, fotografiada en contraste de fase. (Cortesía de W. Bloom.)

La mayoría de los colorantes citológicos o histológicos son de naturaleza orgánica y aromática. Desde Ehrlich se reconocen dos tipos de colorantes: básicos y ácidos. En los colorantes básicos el grupo cromóforo, que imparte el color, es básico (catiónico). Por ejemplo, el azul de metileno es el clorhidrato de tetrametilitionina, cuya parte ácida (HCl) es incolora. Algunas veces los dos componentes de la sal son cromóforos, como en el caso del eosinato de azul de metileno. Los grupos cromó-

foros más usados para los colorantes ácidos contienen el grupo nitrito ($-\text{NO}_2$) y el quinoide. Los grupos cromóforos ácidos contienen el radical azo ($-\text{N}=\text{N}\cdot$) y el indamino ($\cdot\text{N}=\text{N}$). Así, en el ácido pírico hay tres grupos nitro (cromóforos) y un grupo $-\text{OH}$, que se designa también auxocromo y por medio del cual el colorante se combina con el tejido.

Respecto de este punto, es conveniente que el estudiante aprenda cuál es el mecanismo de acción

de la mayoría de los colorantes. Para ello deberá recordar la propiedad que tienen las proteínas, ciertos polisacáridos y ácidos nucleicos de ionizarse como bases o como ácidos.

La ionización ácida se produce por los grupos carboxilo ($-\text{COOH}$), hidroxilo ($-\text{OH}$), sulfato ($-\text{HSO}_4$) o fosfato ($-\text{H}_2\text{PO}_4$). En las proteínas la ionización básica tiene lugar en el grupo amino ($-\text{NH}_2$) y en otros grupos básicos. Si el pH del medio en el que se realiza la coloración es superior al punto isoelectrónico, los grupos ácidos se ionizan. Si es menor, se ionizan los grupos básicos (fig. 2-22). A causa de esta propiedad, por encima de su punto isoelectrónico las proteínas reaccionan con los colorantes básicos (lacas de hematoxilina, azul de metileno, cristal violeta, fucsina básica), y por debajo de él, con los colorantes ácidos (eosina, naranja G, azul de anilina).

Para los ácidos nucleicos, la carga neta está determinada primeramente por la disociación de los grupos fosfato, y el punto isoelectrónico es muy bajo (pH 2 o menos). Por esta causa, la tinción a pH bajo con colorantes básicos, por ejemplo azul de toluidina o azur B, es selectiva para los ácidos nucleicos. El azul de toluidina se emplea frecuentemente para el ácido ribonucleico, y su especificidad puede demostrarse por medio de la hidrólisis previa con ribonucleasa (fig. 3-13).

DETECCION DE SUSTANCIAS EN CELULAS Y TEJIDOS (CITOQUIMICA E HISTOQUIMICA)

El propósito inmediato de la citoquímica consiste en la identificación y localización de los diferentes compuestos químicos dentro de la célula. La histoquímica hace lo propio a nivel tisular.

Este propósito es tanto cualitativo como cuantitativo. Puede realizarse con fines diagnósticos, y en tal sentido debemos señalar que los procedimientos citohistoquímicos (en especial los referidos a la inmunohistoquímica) se convirtieron en un instrumento invaluable en el diagnóstico o pronóstico de innumerables alteraciones histopatológicas.

Las técnicas citohistoquímicas como instrumento de investigación involucran el estudio de los cambios dinámicos en la organización citoquímica durante los distintos estadios funcionales. En tal sentido, es posible establecer el papel que desempeñan los diferentes componentes celulares en los procesos metabólicos de la célula.

El método citohistoquímico en sentido estricto es microscópico, porque comprende una serie de procedimientos químicos y físicos que se emplean para individualizar con el microscopio, o para medir con adaptaciones de éste (microespectrofotómetro), di-

ferentes componentes químicos en el interior de las células o en las matrices extracelulares.

Para cualquier determinación citoquímica de una sustancia deben cumplirse varias condiciones: 1) la sustancia original debe ser inmovilizada y visualizada por el microscopio en su localización celular original; 2) la sustancia debe ser identificada por un procedimiento que sea específico para ella o para el grupo químico al que pertenece.

Esta identificación se verifica mediante: a) reacciones químicas similares a las usadas en química analítica, pero adaptadas a los tejidos; b) reacciones que sean específicas para ciertos grupos de sustancias, o c) medios físicos.

3-19. Detección de lípidos

Los lípidos cuantitativamente más importantes en la célula son los triglicéridos y los fosfolípidos. Los primeros en general se encuentran como gotitas citoplasmáticas. Para evitar la solubilización de los lípidos producida por los solventes orgánicos que se utilizan en los procedimientos de inclusión previos al corte histológico se emplean cortes por congelación.

Recuérdese que el *osmio* es un fijador que insolubiliza a los lípidos (por eso es que en los preparados de microscopía electrónica persiste la bicapa lipídica de las membranas) y al mismo tiempo les imparte un color oscuro, por lo que a veces se lo utiliza como fijador-colorante en preparados de microscopía óptica.

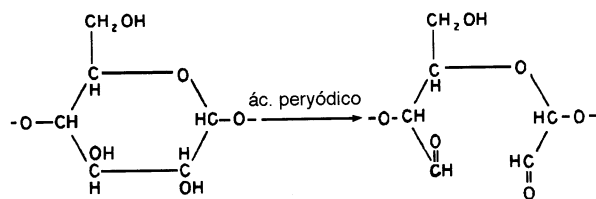
El procedimiento usado con más frecuencia en la demostración de los lípidos consiste en teñirlos con un colorante del grupo del *sudán* o del *aceite rojo O*. Estas sustancias son muy solubles en los lípidos y relativamente solubles en solventes como el alcohol de 70°. Por lo tanto, si una solución de sudanes en alcohol se pone en contacto con una preparación histológica, como el colorante es menos soluble en el alcohol que en los lípidos, tiende a abandonar la solución para pasar a éstos y colorea así tanto las gotitas de triglicéridos como estructuras lipoproteicas del tipo de la mielina o polímeros lipídicos del tipo de la lipofusina.

3-20. Detección de hidratos de carbono

Reacción del PAS. Tanto la reacción del PAS como la de Feulgen y la plasmal se basan en la utilización del reactivo de *Schiff*. Este es un reactivo para grupos aldehído, los cuales se pueden demostrar en algunos hidratos de carbono, en el ADN y en ciertos lípidos.

El reactivo de Schiff se prepara tratando fucsina básica, que contiene parafucsina (cloruro de triaminotriphenilmetano), con ácido sulfuroso. La para-

FIG. 3-14. Esquema químico de un polisacárido en el que se observa el sitio de acción del ácido peryódico en la reacción PAS de McManus. Los aldehídos resultantes reaccionan con el líquido de Schiff.



fucsina se transforma en un compuesto incoloro (ácido bis-N-aminosulfónico o reactivo de Schiff), que luego es recoloreado por grupos aldehído, en este caso los que puedan estar presentes en los tejidos. En realidad, en las reacciones citohistoquímicas en las que interviene el reactivo de Schiff los grupos aldehído provienen de tres orígenes:

- 1) aldehídos libres, presentes en forma natural en los tejidos, como los aldehídos alifáticos de cadena larga (palmital y estearal, derivados ambos de la oxidación de los ácidos grasos correspondientes), que dan la débil reacción plasmal de lípidos;
- 2) aldehídos producidos por hidrólisis selectiva (reacción de Feulgen para ADN —véase más adelante—);
- 3) aldehídos producidos por oxidación selectiva (reacción de PAS para glúcidos).

La reacción de PAS (ácido peryódico-Schiff) fue ideada por McManus y está basada en la generación de grupos aldehído libres —que dan positiva la reacción de Schiff— a través de la oxidación de los grupos glicólicos 1-2 de los polisacáridos por medio del ácido peryódico (fig. 3-14). Este método es positivo en células vegetales para el almidón, la celulosa, la hemicelulosa y las pectinas, y en los tejidos animales para el glucógeno, las mucinas, las mucoproteínas, el ácido hialurónico y la quitina.

Metacromasia. Algunos colorantes básicos del grupo de las tiazinas, especialmente la tionina, el azur B y el azul de toluidina, tienen la propiedad de teñir ciertos componentes celulares con un color que difiere del original del colorante. Esta propiedad se denomina *metacromasia*, y parece depender de la formación de agregados poliméricos del colorante al combinarse con ciertos compuestos.

La reacción es positiva con los glucosaminoglucanos, en particular con los sulfatados (condroitín sulfato, heparina). Recordemos la estructura polimérica de estos compuestos, con sus grupos sulfato regularmente espaciados a lo largo de las moléculas, que brinda las condiciones para la formación de los agregados poliméricos de colorante responsables de la metacromasia.

Los ácidos nucleicos son débilmente metacromáticos, lo mismo que ciertos lípidos ácidos.

3-21. Detección de ácidos nucleicos

Los métodos citoquímicos para ácidos nucleicos dependen de las propiedades de los tres componentes que constituyen sus nucleótidos (pentosa, ácido fosfórico y base nitrogenada) (fig. 2-2).

Reacción de Feulgen. Depende de la presencia de desoxirribosa. En 1924 Feulgen y Rosenbeck

TABLA 3-1. Algunas reacciones específicas empleadas en el análisis citofotométrico (según Moses)

Sustancia	Test o reacción	Máxima absorción (longitud de onda en nm)
Nucleótidos totales	Absorción natural de purinas y pirimidinas	260
Nucleótidos solubles	Absorción natural de purinas y pirimidinas	260
Acido ribonucleico (ARN)	Absorción natural de purinas y pirimidinas	260
Acido desoxirribonucleico (ADN)	Absorción natural de purinas y pirimidinas	260
Acido desoxirribonucleico	Reacción nuclear de Feulgen para la desoxirribosa	550-575
Acido desoxirribonucleico (grupos del ácido fosfórico)	Verde de metilo	645
Acidos nucleicos (grupos del ácido fosfórico)	Azur A	590-625
Proteínas (grupos básicos libres)	Verde rápido (fast green)	630
Proteínas (tirosina)	Reacción de Millon	355
Polisacáridos con grupos 1-2 glicólicos	Reacción de PAS (ácido peryódico-Schiff)	~550

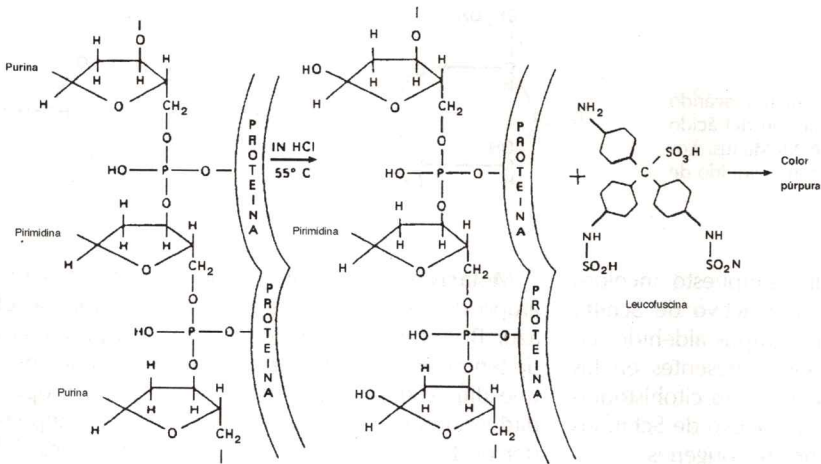


FIG. 3-15. Química de la reacción nuclear de Feulgen. La hidrólisis ácida extrae las purinas y deja en libertad los grupos aldehído que reaccionan con la leucofuscina (reactivo de Schiff) para dar el color púrpura. En el esquema, el tamaño de la desoxipentosa está muy exagerado en relación con el de la proteína. (De Lessler, 1953.)

desarrollaron la llamada reacción nuclear. En este método, los cortes de tejido fijados se someten a una hidrólisis ácida débil con ácido clorhídrico y luego se tratan con el reactivo de Schiff. Esa hidrólisis es suficiente para extraer el ARN, que desaparece, pero no el ADN. El mecanismo de la reacción tiene los siguientes pasos: 1) la hidrólisis ácida extrae las purinas a nivel de la unión desoxirribosapurina del ADN y de esa manera libera los grupos aldehído de la desoxirribosa; 2) los grupos aldehído libres reaccionan con el reactivo de Schiff (fig. 3-15).

La especificidad de la reacción se confirma tratando los cortes con desoxirribonucleasa, enzima que hidroliza el ADN.

Cuando se aplica a la célula, la reacción es positiva en el núcleo y negativa en el citoplasma. En el núcleo, las masas de cromatina condensadas son particularmente positivas; el nucléolo es Feulgen negativo (fig. 3-16).

En condiciones estrictamente controladas, la intensidad de esta coloración se correlaciona con la cantidad de ADN presente, la que se puede establecer mediante *citoespectrofotometría*. La determinación de la ploidía celular por este método se emplea particularmente en el estudio de ciertos tumores humanos, en especial como indicador pronóstico y como factor condicionante de la terapia a encarar.

La tabla 3-1 indica algunas otras reacciones histoquímicas pasibles de ser evaluadas cuantitativamente con métodos citofotométricos.

Basofilia. Como ya vimos en la sección 3-4, está originada en la presencia de los grupos fosfato tanto del ADN como del ARN. Se utilizan mucho el azur B y el azul de toluidina. A pH muy bajo, este último colorea de manera preferente el ADN. El verde de metilo, que en ciertas condiciones colorea sobre todo al ADN, también se une a los grupos fosfato.

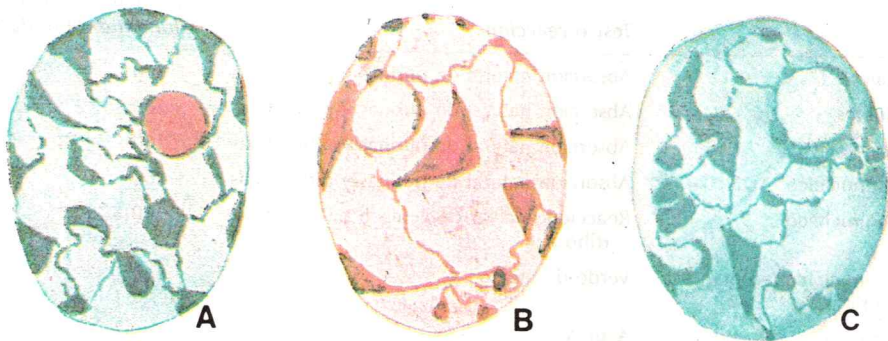


FIG. 3-16. Núcleos interfásicos de células pancreáticas. Fijación por congelación y desecación. **A.** Coloración con azán: se destacan el núcleo en rojo, los filamentos cromonémicos con partes engrosadas (cromocentros) y el jugo nuclear. **B.** Reacción de Feulgen: el nucléolo da una reacción negativa, mientras que en el jugo nuclear la reacción es ligeramente positiva. **C.** Acción de la ribonucleasa y coloración con azán: el nucléolo no se tiñe a causa de la digestión del ácido ribonucleico. (De Robertis, Montes de Oca y Raffaele.)

Absorción de luz ultravioleta. La presencia de bases nitrogenadas pirimidínicas y purínicas, tanto en el ADN como en el ARN, es la responsable de la intensa absorción de la luz ultravioleta en la longitud de onda de 260 nm, que también puede cuantificarse por citofotometría. Como el ojo humano no es sensible a este tipo de radiación, la imagen microscópica debe registrarse en una placa fotográfica.

Naranja de acridina. Utilizando el colorante naranja de acridina sobre un corte de tejido, luego de la acetilación, es posible obtener una fluorescencia verde para el ADN y roja para el ARN. Ambas fluorescencias pueden analizarse simultáneamente utilizando un citofluorómetro especial.

3-22. Detección de proteínas

Actividad enzimática. La actividad de muchas enzimas puede evidenciarse microscópicamente. En algunos casos la preservación de esta actividad requiere de cortes efectuados con el crióstato, sin fijar. En otros casos, la enzima resiste una breve fijación en acetona fría, formaldehído, glutaraldehído y otros dialdehídos.

Las técnicas enzimáticas se basan en la incubación de los cortes de tejido con un sustrato apropiado. Por ejemplo, en el método de Gomori para

la fosfatasa alcalina se emplean como sustratos ésteres fosfóricos de glicerol. El ion fosfato liberado por hidrólisis enzimática se convierte en una sal metálica insoluble generalmente en presencia de calcio, y ésta, a su vez, se puede visualizar por su conversión en sulfuro de plomo, plata metálica, sulfuro de cobalto u otros compuestos coloreados.

Fosfatasas. Son enzimas que liberan ácidos fosfóricos a partir de diversos sustratos. Se diferencian entre sí por la especificidad para el sustrato, el pH óptimo y la acción de activadores o inhibidores. Las más comunes son las fosfomonoesterasas, que hidrolizan ésteres simples que resultan de la unión P-O, y las fosfamididas, que hidrolizan las uniones P-N. En la tabla 3-2 se citan las fosfatasas más comunes estudiadas histoquímicamente, con algunos de los sustratos empleados. Un ejemplo de la fosfatasa alcalina, relacionada con fenómenos de permeabilidad, es el de la figura 3-17.

Esterasas. Catalizan la siguiente reacción reversible:



Se las ha dividido en: a) esterases simples o alies-terasas, que hidrolizan ésteres de cadenas alifáticas cortas; b) lipasas, que atacan ésteres con cadenas de carbono largas, y c) colinesterasas, que actúan sobre ésteres de colina.

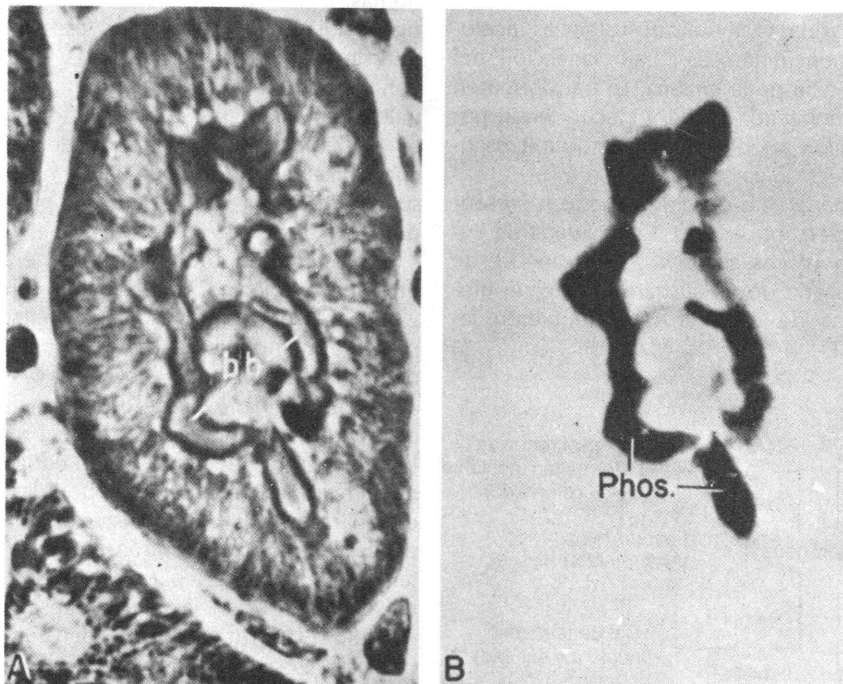


FIG. 3-17. Túbulo contorneado proximal de riñón de ratón después de la fijación por congelación y sustitución. A. Observación con contraste de fases en un medio de índice de refracción = 1,460. B. Examen con luz transmitida. Phos., reacción de la fosfatasa alcalina. (Cortesía de B. J. Davies y L. Ornstein.)

TABLA 3-2. Algunas fosfatasa estudiadas citoquímicamente

Tipo	Sustrato
<i>Fosfomonoesterasas</i>	
Fosfatasa alcalina	α o β-glicerofosfato Naftilfosfato Adenosina trifosfato
Fosfatasa ácida	
Adenosina trifosfatasa (ATPasa)	
5-Nucleotidasa	Acido 5-adenílico
Fosfamidasa	Fosfocreatina Diamidas del ácido naftilfosfórico
Glucosa 6-fosfatasa	Glucosa 6-fosfato
Tiamina pirofosfatasa	Tiamina pirofosfato
Pirofosfatasa	Pirofosfato de sodio Dinaftilpirofosfatos
<i>Fosfodiesterasas</i>	
Ribonucleasa	Acido ribonucleico
Desoxirribonucleasa	Acido desoxirribonucleico

Hidrolasas ácidas. Otras enzimas hidrolíticas susceptibles de estudio histoquímico son la glucuronidasa, las galactosidasas, la arilsulfatasa y otras hidrolasas lisosómicas.

Oxidasa. Son enzimas que catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato dador hacia el oxígeno. Generalmente contienen hierro (catalasa y peroxidasa) o bien poseen cobre (tirosinasa y polifenoloxidasa).

Para las peroxidasa se utilizan sustancias incoloras como la bencidina. Esta, bajo la acción del H₂O₂ en presencia de la enzima, se transforma en una sustancia coloreada parda y electrodensa, por lo que la reacción puede estudiarse con microscopia óptica y electrónica.

Deshidrogenasas. Las deshidrogenasas representan los primeros componentes de la cadena de enzimas que, en etapas sucesivas, son capaces de transferir hidrógeno de un sustrato al oxígeno molecular. Algunas de estas enzimas requieren las coenzimas NAD⁺ o NADP⁺.

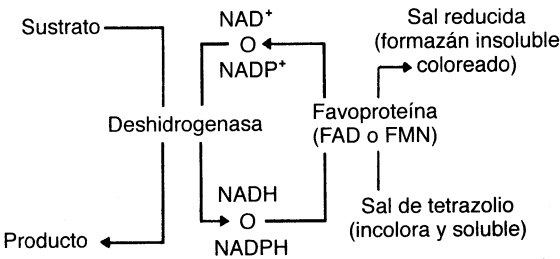


FIG. 3-18. Representación esquemática de la transferencia de electrones a la sal de tetrazolio. FAD, flavina adenina dinucleótido; NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleótido; NADP⁺, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

Entre las enzimas más conocidas que usan NAD⁺ se encuentran la láctico deshidrogenasa (que transforma al lactato en piruvato), la málico deshidrogenasa, etc. Entre las enzimas que utilizan NADP⁺ se hallan la isocítrico deshidrogenasa y la enzima málica.

La figura 3-18 representa en forma general el mecanismo de acción de estas reacciones histoquímicas.

3-23. La inmunohistoquímica es un método muy específico y sensible

La inmunohistoquímica se basa en la detección de sustancias tisulares por medio de anticuerpos. Dichos anticuerpos pueden obtenerse mediante la inmunización de animales de laboratorio contra la proteína, el polisacárido, el ácido nucleico u otro tipo de molécula que se desea detectar, en cuyo caso las inmunoglobulinas son producidas por varios clones de plasmocitos contra diferentes epítopes de aquella. Por tal motivo, estos anticuerpos se denominan policlonales.

Otra posibilidad, que le valió el Premio Nobel a C. Milstein, consiste en fusionar células inmortales de un plasmocitoma (neoplasia maligna de los plasmocitos) con linfocitos B de un ratón sensibilizado contra la sustancia que se desea detectar. Las células B fusionadas resultantes se conocen como hibridomas. Dado que en el laboratorio se aíslan colonias celulares (clones) en las fases iniciales, cada una de ellas proveniente de una única célula, los anticuerpos que producen se denominan monoclonales. Recientemente la ingeniería genética ingresó en el campo de la producción de anticuerpos, lo cual constituye un rápido avance hacia el ideal de su obtención “a medida” de la proteína que se desea detectar.

En la inmunohistoquímica se hace actuar, sobre un corte histológico, una solución con la inmunoglobulina (anticuerpo) capaz de unirse específicamente al componente del tejido que se pretende demostrar (el antígeno). Luego se lava el preparado, a fin de eliminar de éste todas las moléculas del anticuerpo no unidas a su antígeno. Obviamente, los anticuerpos que permanecen unidos al antígeno no son visibles por sí mismos; por ello es necesario emplear sistemas de visualización, habitualmente de tipo enzimático, aunque también se usan sustancias fluorescentes para el correspondiente microscopio, o sustancias electrodensas como el oro coloidal o la ferritina que pueden ser identificadas con la microscopia electrónica.

Se han desarrollado seis generaciones sucesivas de sistemas, que en orden cronológico de aparición son: las marcaciones directas, las marcaciones indirectas de un paso, los sistemas de tipo peroxidasa-

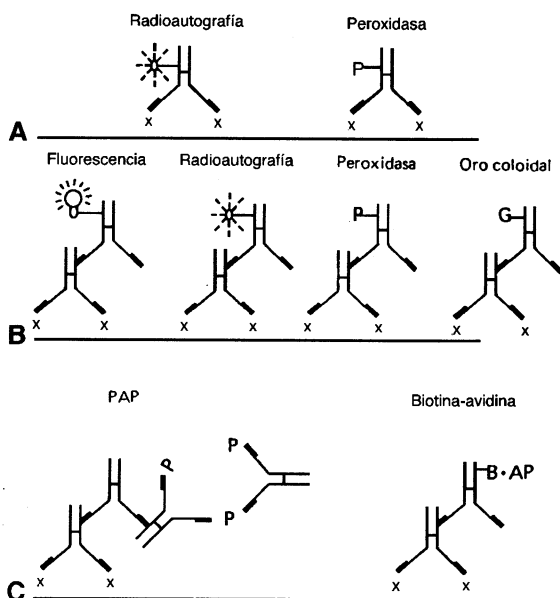


FIG. 3-19. Esquema que representa diferentes procedimientos inmunocitoquímicos. A ilustra algunos de los métodos directos en una sola etapa. B y C, diversos procedimientos indirectos o de varios pasos descritos en el texto. (Cortesía de A. C. Cuello.)

antiperoxidasa, los sistemas de tipo avidina-biotina (ABC), la tecnología de polímeros (ENVISION) y los sistemas de amplificación de la señal catalizada (CSA).

En la *marcación directa* se liga una enzima, fluorocromo o metal pesado al anticuerpo. Este sistema es de muy baja sensibilidad, de modo que su utilidad se restringe actualmente a las técnicas de inmunomicroscopía electrónica cuantitativa.

En las *marcaciones indirectas de un paso* aparece el concepto de anticuerpo primario y secundario; el primario es el dirigido contra la proteína que se desea detectar y el secundario un anticuerpo contra el anticuerpo primario, marcado enzimáticamente. Esto aumenta la sensibilidad del método y facilita el trabajo, puesto que para varios anticuerpos primarios se emplea el mismo secundario (por ejemplo, para todos los anticuerpos primarios monoclonales producidos por hibridomas de ratón se puede utilizar un mismo secundario antiinmunoglobulinas de ratón, producido inmunizando un conejo o una cabra) (fig. 3-19).

El primer gran avance en el aumento de la sensibilidad se observó con el desarrollo de los sistemas de tipo peroxidasa-antiperoxidasa. En éstos, luego de incubar con el anticuerpo primario, se emplea un anticuerpo secundario en exceso que hará de puente entre el primario y un complejo de la enzima peroxidasa con anticuerpo antiperoxidasa. Es

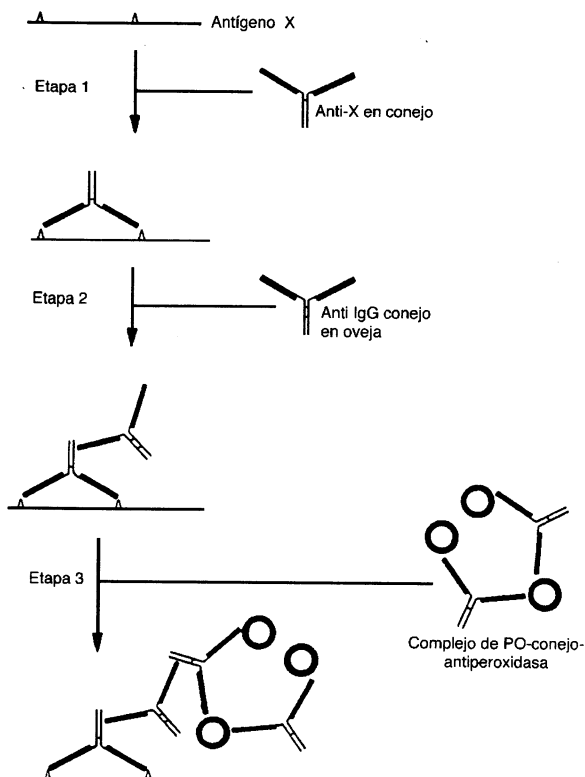


FIG. 3-20. Esquema que ilustra el método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). Después de las etapas 1 y 2, que son semejantes a las de la figura 3-19, en la 3 se introduce el complejo conejo-PAP. En un paso siguiente la enzima es revelada por el método DAB (diaminobencidina y H_2O_2). Para la microscopía electrónica, después de esto se realiza la fijación con osmio. (Cortesía de L. A. Sternberger.)

importante que los anticuerpos antiperoxidasa sean producidos en el mismo animal que el anticuerpo primario, para que el secundario pueda actuar como puente (fig. 3-20).

Los *sistemas ABC* se basan en el uso de las lectinas. Estas son sustancias de estructura polisacárida obtenidas de vegetales, bacterias, huevos, etc., capaces de ligarse con extraordinaria afinidad. Para su empleo se liga biotina a los anticuerpos secundarios, después de lo cual se incuba el tejido con un complejo de avidina marcada con peroxidasa. Recientemente la avidina ha sido reemplazada por la estreptoavidina (producida por los estreptococos), que tiene mayor afinidad y menor tendencia a adherirse inespecíficamente a los tejidos.

La *tecnología de polímeros* consiste en montar los anticuerpos y las enzimas sobre macromoléculas muy flexibles y estables en solución, de modo que se puede reducir la técnica a un solo paso e inmediatamente revelar. Este sistema se ha patentado con el nombre de EPOS, pero no ha adquirido la popularidad de su contraparte ENVISION, en la cual el polímero se emplea como anticuerpo se-

cundario. Esta tecnología ha aumentado significativamente la sensibilidad de las técnicas inmunohistoquímicas, ya que permite utilizar los anticuerpos primarios en muy bajas diluciones.

El salto más reciente en sistemas de detección se ha dado con la aparición del *sistema de amplificación de la señal catalizada* (CSA), que consiste en efectuar una inmunomarcación convencional con sistema biotina-estreptoavidina hasta el paso del revelado. Normalmente las marcaciones con la enzima peroxidasa se revelan con diaminobencidina (DAB), la cual permanece incolora y estable en solución hasta que se oxida con el oxígeno naciente en la degradación del peróxido de hidrógeno por acción de la peroxidasa, tras lo cual precipita como su derivado de coloración parda. El sistema CSA emplea para el paso del revelado un derivado fenólico biotinilado incoloro y estable en solución hasta que se oxida con el oxígeno naciente en la degradación del peróxido de hidrógeno por acción de la peroxidasa y precipita en el tejido, en el que deja gran cantidad de biotina. Luego el tejido se incuba de nuevo con estreptoavidina ligada a peroxidasa y finalmente se efectúa el revelado convencional con DAB. Este sistema multiplica unas 1.000 veces la sensibilidad respecto al sistema ABC.

Es interesante destacar que lo estudiado acerca de los sistemas de detección en inmunohistoquímica es extrapolable a las técnicas de hibridación *in situ*, aunque deben señalarse las diferencias puntuales (por ejemplo, no existe un equivalente de los anticuerpos secundarios y las sondas se biotinilan directamente).

RADIOAUTOGRAFIA

La radioautografía se basa en la posibilidad de marcar componentes de la célula con radioisótopos, que pueden ser demostrados después por medios fotográficos. En una radioautografía la sustancia radioisotópica es incorporada a la célula viva, y luego se la localiza confeccionando un preparado histológico mediante las técnicas habituales y cubriendo el preparado (en la oscuridad de un laboratorio fotográfico) con una delgada placa fotográfica transparente. Como los radioisótopos (al igual que la luz) tienen la propiedad de sensibilizar las sales de plata de la película, al cabo de un tiempo se revela el preparado entero (portaobjeto, tejido y placa adherida) como si fuera una fotografía común. Ya en la luz, se colorea el preparado y se lo observa con el microscopio. La imagen obtenida resulta de la superposición de la imagen del preparado con la de los granos de plata, oscuros, en la delgada película (fig. 3-21).

En radioautografía se utilizan ampliamente sustancias marcadas con un emisor β . Con este emisor es factible realizar también la radioautografía de trayecto, que consiste en aplicar una gruesa capa líquida fotográfica en lugar de la placa fina. En esta técnica el contacto resulta aún más íntimo, y es posible seguir y contar cada uno de los trayectos de la emisión β que proviene de un área definida, lo cual permite una estimación cuantitativa con una resolución de 1 a 2 μm .

Las sustancias marcadas con tritio, que es un emisor β blando, son las de uso más difundido en

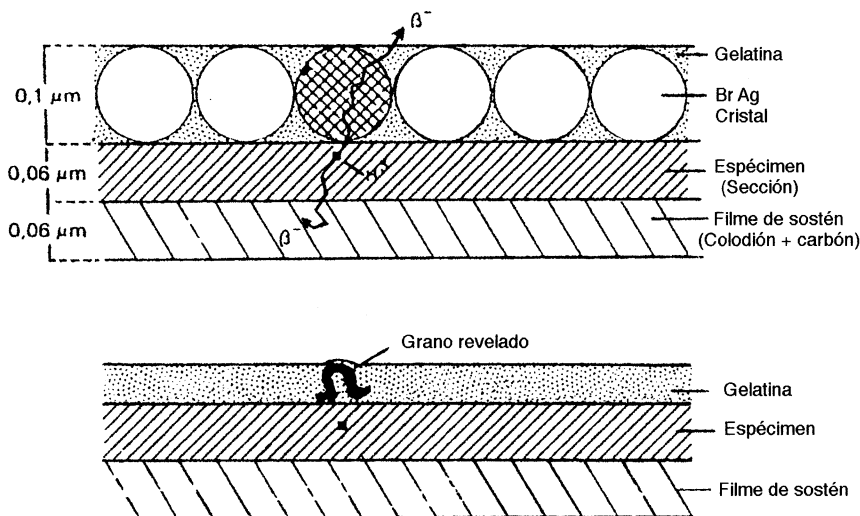


FIG. 3-21. Representación esquemática de una preparación radioautográfica examinada con el microscopio electrónico durante la exposición: los cristales de halógeno de plata que se encuentran en una matriz gelatinosa cubren el corte; una partícula β , de un átomo de tritio en el espécimen, choca con un cristal (línea de cruces) y da lugar a la aparición de una imagen latente sobre la superficie. Abajo, examen después del revelado: el cristal expuesto se ha desarrollado en un filamento de plata; los cristales no expuestos se disolvieron. (Cortesía de L. G. Caro.)

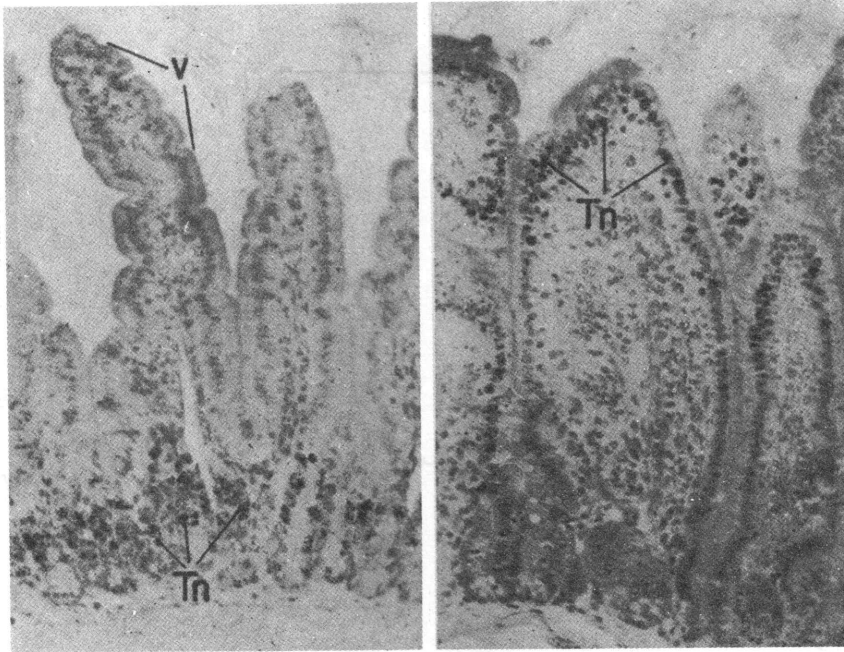


FIG. 3-22. Corte de intestino de ratón inyectado con timidina tritiada. A la izquierda, sacrificado a las 8 horas de la inyección, y a la derecha, sacrificado a las 36 horas (véase la descripción en el texto). (Cortesía de C. P. Leblond.)

radioautografía. La timidina tritiada se empleó para estudiar el metabolismo del ADN, puesto que se trata de una base específica de este ácido. Con el empleo de precursores apropiados se realizaron importantes investigaciones sobre el mecanismo de duplicación del ADN y el metabolismo del ARN (en este caso con uridina tritiada).

En el ejemplo expuesto en la figura 3-22, los núcleos marcados con timidina tritiada, que se localizaban en el fondo de las criptas intestinales de una rata, se encuentran en el extremo de las vellosidades en el intestino de otra rata que recibió timidina junto con la primera, pero que fue sacrificada 36 horas más tarde. Estos resultados indican de manera gráfica el ciclo vital de una célula. Una vez que ésta replica su ADN para dividirse en el fondo de la cripta, asciende a lo largo del epitelio y finalmente es destruida, al cabo de pocas horas, en el extremo de la vellosidad.

FRACCIONAMIENTO CELULAR

Estos métodos consisten en la separación y aislamiento de diversos componentes celulares, para su posterior estudio mediante técnicas bioquímicas o de biología molecular. Se basan esencialmente en la homogeneización de los tejidos y la destrucción de los límites celulares por medio de diferentes procedimientos mecánicos o químicos, con ulterior

separación de las fracciones subcelulares de acuerdo con su masa, superficie y peso específico.

Actualmente se utilizan diversos métodos de fraccionamiento celular. La mayoría están basados en la homogeneización mecánica de la célula, generalmente en sacarosa a diferentes concentraciones.

En la figura 3-23 se esquematiza un procedimiento corriente de fraccionamiento por *centrifugación diferencial*. En este ejemplo clásico, el hígado de un animal es perfundido primero con una solución salina helada (para eliminar la sangre) y luego con sacarosa 0,25 M también fría. Se hace atravesar un trozo de tejido por un disco de acero perforado, y se lo homogeneiza en la solución de sacarosa 0,25 M. Por último, se centrifuga el homogeneizado como se especifica en la figura, por medio de una centrífuga refrigerada.

Este tipo de fraccionamiento celular se utiliza para subdividir a los componentes celulares en cuatro *fracciones* diferentes: nuclear, mitocondrial, microsómica y soluble. En algunos tejidos glandulares se obtiene también una quinta fracción que contiene los gránulos de secreción.

Es importante a esta altura hacer referencia a la pureza de las fracciones obtenidas, así como también al problema de la nomenclatura. Debe diferenciarse con claridad entre las fracciones y las partes de la célula que se encuentran en ellas. En la fracción mitocondrial del hígado, por ejemplo, no

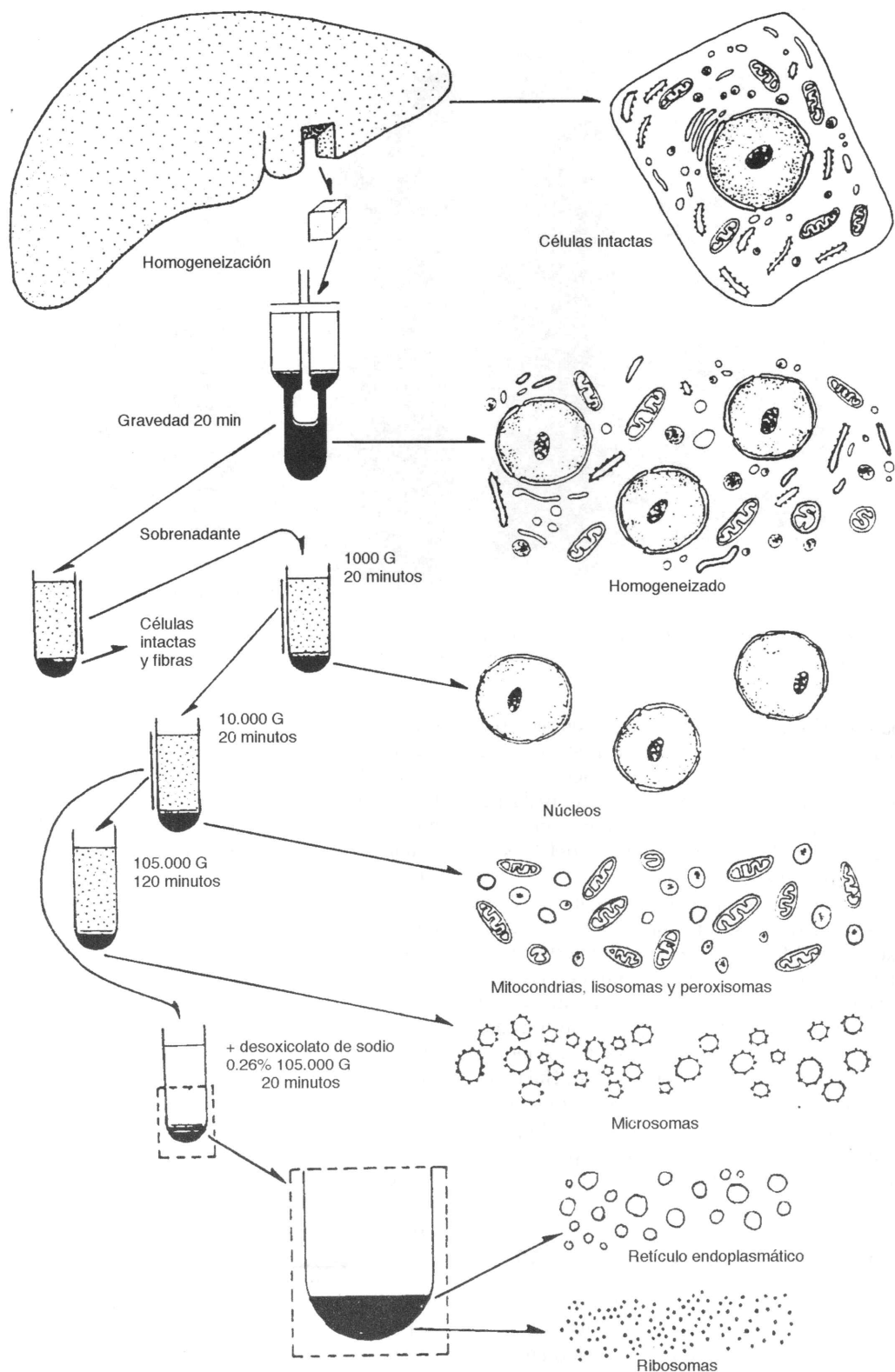


FIG. 3-23. Diversas etapas en la técnica de centrifugación diferencial. Un trozo de hígado es homogeneizado y luego sometido a una serie de centrifugaciones de fuerza centrífuga creciente (lado izquierdo de la figura). En el lado derecho se ilustran las diversas subfracciones que aparecen bajo el microscopio electrónico. (Modificado de Bloom W. and Fawcett, D. W. [1968] A Textbook of Histology, 9th ed. Saunders.)

cabe duda de que este organoide constituye su principal componente, pero la “fracción mitocondrial” del cerebro es muy heterogénea y contiene, además de las mitocondrias libres, terminaciones nerviosas y mielina. Los microsomas no existen como tales en la célula; la fracción microsómica del fraccionamiento celular contiene principalmente partes fragmentadas de retículo endoplasmático, ribosomas, complejo de Golgi y otras membranas (cap. 8).

3-24. La centrifugación diferencial y en gradiente permite separar componentes celulares y macromoléculas

El método ejemplificado en la figura 3-23 para la separación de las partículas subcelulares recibe, como vimos, el nombre de centrifugación diferencial. Según la fuerza de gravitación requerida, se utilizan para tal fin *centrífugas ordinarias* o *preparativas*. Antes de la centrifugación todas las partículas están distribuidas homogéneamente, pero a medida que tiene lugar la centrifugación se depositan de acuerdo con sus respectivas velocidades de sedimentación.

Un principio similar al anterior puede utilizarse para separar partículas aún más pequeñas, como virus o macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, etc.), en la *ultracentrífuga analítica*. Con este aparato se puede determinar el coeficiente de sedimentación. Este coeficiente, expresado en *unidades Svedberg* (S), guarda relación con el peso molecular de la partícula. Así, el ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) 4S tiene un peso molecular de 20 kDa, mientras que el ARN 18S del ribosoma tiene un peso molecular de 700 kDa.

Las técnicas de ultracentrifugación diferencial son susceptibles de ser perfeccionadas con la introducción de *gradientes de densidad*, sean éstos discontinuos o continuos, obtenidos por soluciones de sacarosa de diferentes concentraciones desde el fondo del tubo hasta la superficie. Una vez que se ha formado cualquiera de los dos gradientes, la muestra es colocada sobre éstos y se centrifuga hasta que las distintas partículas alcancen su posición de equilibrio con respecto al gradiente. Por tal causa, este tipo de separación se denomina también *centrifugación isopícnica*.

Variantes más complejas de este método comprenden el uso de agua pesada, cloruro de cesio o medios con diferentes coeficientes de partición.

Para evitar cambios drásticos en la presión osmótica se utilizan macromoléculas como glucógeno o Ficoll. El gradiente se basa fundamentalmente en diferencias de viscosidad del medio.

La *centrifugación zonal* se desarrolló con el advenimiento de los denominados rotores zonales de

las centrífugas. Aquí el gradiente se forma mientras el rotor está girando; se introduce entonces la muestra y se centrifuga hasta que las partículas alcanzan su zona de sedimentación isopícnica correspondiente. La centrifugación isopícnica en rotores preparativos o zonales permite determinar la *densidad de flotación* de una macromolécula, es decir, la densidad en que ésta se encuentra en equilibrio con el medio.

ANÁLISIS MOLECULAR DEL ADN E INGENIERÍA GENÉTICA

3-25. Los métodos de secuenciamiento del ADN han permitido conocer la composición molecular de muchos sectores de los cromosomas

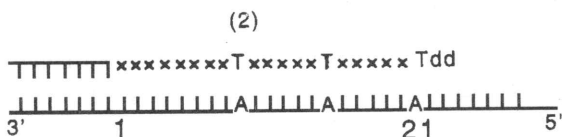
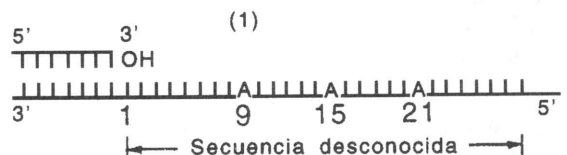
La secuencia de los nucleótidos de un gen puede ser parcialmente deducida a partir de la secuencia de los aminoácidos de la proteína que codifica. Decimos “parcialmente” porque este recurso abarca sólo la parte codificadora del gen y deja de lado los sectores reguladores y los que no codifican (intrones). Más aún, ignora una característica saliente del código genético, la que determina que un aminoácido puede ser codificado por más de un códon.

Se han desarrollado métodos que permiten un rápido *secuenciamiento del ADN*, lo que ha producido una verdadera revolución en el mundo de la biología molecular. Gracias a ellos se ha llegado a conocer la composición de numerosos genes humanos —nucleares y mitocondriales— y también la de extensos sectores no genéticos de los cromosomas. La investigación no ha descuidado el estudio del ADN de otras especies eucariotas, así como el de diversas bacterias y virus.

Los métodos de secuenciamiento se basan en la producción de fragmentos de ADN de diferentes longitudes, que empiezan en un punto fijo y terminan en uno de los cuatro tipos de nucleótidos. Luego esos fragmentos se separan sobre la base de sus tamaños en un gel de poliacrilamida, en el que se lee la secuencia de los nucleótidos del ADN en estudio. La figura 3-24 muestra las etapas del método de secuenciamiento llamado de *terminación de cadena*, que comienza con la desnaturalización del ADN que se quiere analizar a fin de obtener moléculas de una sola cadena (cap. 2-6). Esta cadena se copia mediante la ADN polimerasa de la *Escherichia coli*, que comienza a sintetizar la cadena complementaria luego de haberse colocado en el extremo 3' de la cadena original un *cebador*, es decir, un fragmento de ADN que deja expuesto su propio extremo 3', a partir del cual crece la nueva cadena. En la actualidad los cebadores se preparan

sintéticamente. La ADN polimerasa agrega los sucesivos nucleótidos como lo hace durante la replicación del ADN. Debe señalarse que se emplean nucleótidos marcados con una sustancia radiactiva.

Los procedimientos que estamos describiendo se realizan en forma simultánea en cuatro dispositivos independientes. La síntesis de la cadena nueva se interrumpe en sitios específicos debido a que cada uno de los cuatro medios contiene uno de los 2',3'-didesoxinucleótidos correspondientes a una de las cuatro bases (se representan con las siglas ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP). En efecto, estas moléculas, al incorporarse a las cadenas en crecimiento, bloquean la síntesis del ADN a nivel de los correspondientes nucleótidos complementarios, es decir,



(3) Gel

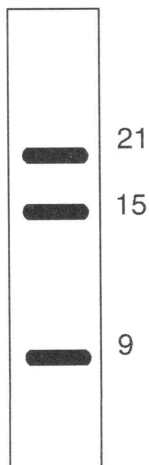


FIG. 3-24. Pasos en el método de terminación de cadena para secuenciar el ADN. 1. Se coloca un fragmento de ADN (cebador) sobre el ADN monocatenario que se desea secuenciar. 2. Se produce la síntesis de la segunda cadena del ADN mediante la ADN polimerasa y los cuatro nucleósidos trifosfato. La síntesis se detiene por el agregado de didesoxinucleótidos. Por ejemplo, el ddTTP detiene la copia en las distintas timinas de la cadena en crecimiento. 3. Para la lectura de la secuencia se desnaturaliza el ADN y las cuatro reacciones se corren por electroforesis en un gel de poliacrilamida (se muestra sólo la correspondiente a la timina).

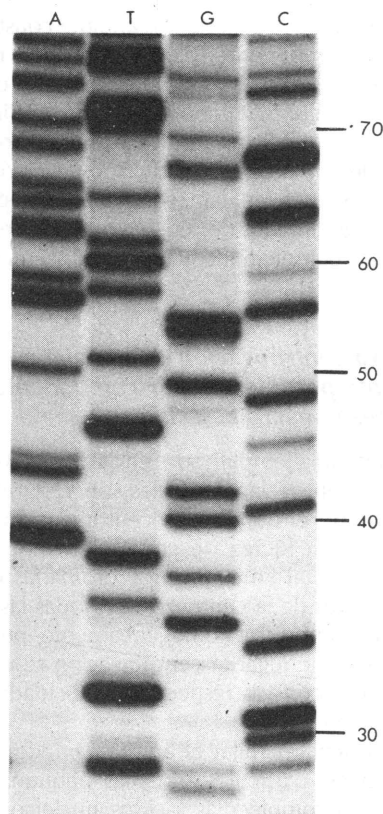


FIG. 3-25. Gel de poliacrilamida que muestra la secuencia de un fragmento de ADN. Cada señal representa las cadenas de ADN terminadas en uno de los cuatro nucleótidos. (Cortesía de W. Barnes.) En este ejemplo la secuencia es:

CCTGCGTGTA GCGAACTGCG ATGGGCATAC TGTAAACCATA
30 40 50 60

a la altura de las adeninas en uno de los dispositivos, de las guaninas en el otro, de las citosinas en el tercero, y de las timinas en el cuarto. El bloqueo se produce porque los 2',3'-didesoxinucleótidos carecen del OH en la posición 3' de sus desoxirribosas, lo cual impide que se agreguen los nucleótidos siguientes. Como resultado, en cada dispositivo se generan cadenas de ADN de distinta longitud, comenzando todas en un punto común pero terminando cada una en un sitio específico y singular.

Para leer la secuencia, las cuatro reacciones se corren simultáneamente en un gel de poliacrilamida, con lo cual se separan los fragmentos de ADN sobre la base de sus tamaños. En el gel cada una de las cuatro calles corresponde a uno de los nucleótidos, los cuales se revelan por radioautografía. La secuencia se lee integrando la información emanada de las posiciones de las bandas en cada calle. Por ejemplo, en la figura 3-25 la banda 30 se halla en calle C, por lo que corresponde a una citosina. Es recomendable que el estudiante haga el ejercicio

de leer dicha figura y luego compare el resultado con la secuencia indicada en la leyenda. Las secuencias entre las posiciones 30 y 70 pueden leerse con toda claridad.

3-26. La técnica del ADN recombinante hace posible el estudio de los genomas

La secuenciación de las moléculas de ADN en los virus, bacterias, mitocondrias y cloroplastos es relativamente sencilla porque son moléculas pequeñas y se pueden obtener en forma pura. En cambio, cualquiera de los cromosomas nucleares eucariotas contiene una molécula de ADN muy larga y por lo tanto mucho más difícil de estudiar.

Este problema pudo resolverse mediante las técnicas de *ADN recombinante* —llamadas de *ingeniería genética*—, en las que se toman segmentos cortos de ADN y se los une a ciertos cromosomas bacterianos circulares muy pequeños, llamados *plásmidos*. Luego, al multiplicarse las bacterias, la repetida replicación del ADN bacteriano —incluida la del plásmido— da lugar a una gran cantidad de segmentos de ADN idénticos al insertado originalmente en el plásmido, los cuales se pueden separar. Estos segmentos sirven para diversos fines; por ejemplo, puede establecerse su secuencia para descubrir su composición molecular mediante la técnica descrita en la sección anterior.

3-27. Las endonucleasas de restricción reconocen secuencias específicas en el ADN

Las técnicas del ADN recombinante son posibles gracias al empleo de *endonucleasas de restricción*, que son enzimas que reconocen secuencias espe-

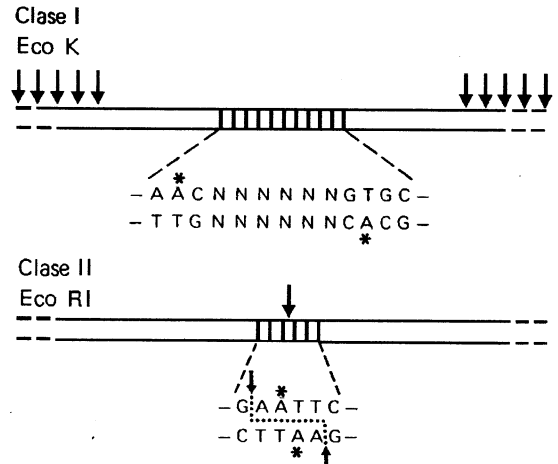


FIG. 3-26. Los dos tipos principales de endonucleasas de restricción. Ambos tipos reconocen secuencias de nucleótidos específicas, pero las enzimas de la clase I se deslizan a lo largo del ADN antes de cortarlo (flechas), mientras que las de la clase II lo cortan dentro de la secuencia reconocida. La endonucleasa Eco K corta el ADN a varios centímetros de los sitios de reconocimiento, en ambas direcciones. La Eco RI reconoce una secuencia de cuatro nucleótidos. Los asteriscos indican nucleótidos metilados, lo que los protege del corte por las enzimas de restricción.

cíficas de nucleótidos en las moléculas de ADN, a las que cortan en esos lugares.

Existen dos clases principales de endonucleasas de restricción (fig. 3-26). Las llamadas de *clase I* reconocen una secuencia específica, pero cortan al ADN en otros sitios —específicos también—, los cuales pueden estar a cientos de nucleótidos del lugar reconocido; por tal motivo estas endonucleasas no son útiles en ingeniería genética. En cambio, las endonucleasas de *clase II* constituyen una espe-

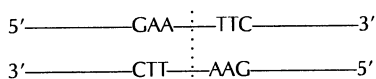
TABLA 3-3. Secuencias reconocidas por algunas endonucleasas de restricción

Nombre	Secuencia	Extremos libres después del clivaje	Origen
Eco RI	↓ —GAATTC— —CTTAAG— ↑	—G —CTTAA	AATTC— G— <i>E. coli</i> con el plásmido RI
Hind III	↓ —AAGCTT— —TTCGAA— ↑	—A —TTCTGA	AGCTT— A— <i>Haemophilus influenzae</i> serotipo D
Bam I	↓ —GGATCC— —CCTAGG— ↑	—G —CCTAG	GATCC— G— <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Hae III	↓ —GGCC— —CCGG— ↑	—GG —CC	CC— GG— <i>Haemophilus aegypticus</i>

cie de bisturí molecular que corta al ADN en los propios sitios reconocidos.

La denominación de las distintas endonucleasas de restricción procede de los nombres de los microorganismos de los cuales fueron aisladas (tabla 3-3). Por ejemplo, la Eco RI es una enzima de la *Escherichia coli* contenida en un plásmido llamado RI, el cual le confiere a la bacteria resistencia a ciertas drogas.

Las enzimas de restricción de clase II generalmente reconocen secuencias integradas por cuatro a seis nucleótidos (tabla 3-3). Las que reconocen cuatro nucleótidos producen fragmentos de ADN cortos (unos 250 pares de bases). Las que reconocen seis nucleótidos producen fragmentos más largos (de alrededor de 4.000 pares de bases). Una característica importante de estas secuencias es que son simétricas, por ejemplo:



Como se ve, existe un eje de simetría a partir del cual la secuencia se lee igual en ambas cadenas en la dirección 5'→3'. Algunas enzimas actúan en el punto medio y producen un corte neto (véase la endonucleasa Hae III en la tabla 3-3). Otras producen cortes sesgados, por lo que generan a nivel del corte extremos de ADN de una sola cadena, que pueden aparearse con otros complementarios. En consecuencia, esos extremos —llamados “adhesivos”— pueden unirse a cualquier fragmento de ADN que haya sido cortado por la misma endonucleasa de restricción, condición necesaria para que tengan lugar las reacciones centrales de la ingeniería genética.

La mayoría de las células procariotas tiene endonucleasas de restricción; su principal función es proteger a las bacterias cuando son invadidas por algún ADN foráneo. Por ejemplo, si un bacteriófago infecta a una bacteria, ésta puede destruir el ADN viral mediante las endonucleasas presentes en su protoplasma. Debe señalarse que el ADN de la propia bacteria no es afectado debido a que la célula procariota posee enzimas que lo metilan en las secuencias donde las endonucleasas podrían actuar, lo que hace invulnerable al ADN.

El fenómeno que acabamos de describir fue descubierto en los años cincuenta, siguiendo el comportamiento de las cepas de *Escherichia coli* K12 y B luego de ser infectadas por bacteriófagos. Se encontró que el bacteriófago *lambda*, que infecta a la cepa K12, no infecta a la cepa B y viceversa. La diferencia se debe a que los ADN de ambas cepas se metilan en sitios distintos. La comprensión de este fenómeno fue la que llevó al descubrimiento de las enzimas de restricción.

3-28. Los genes eucariotas pueden ser introducidos en plásmidos y clonados en bacterias

Vimos que las bacterias tienen un pequeño ADN circular —el plásmido— que se replica en forma autónoma. Entre los plásmidos más conocidos se encuentran los que generan los factores de resistencia a los antibióticos, llamados factores R. También vimos que un fragmento de ADN eucariota puede ser incorporado a un plásmido (con la ayuda de endonucleasas de restricción) e introducido en una bacteria para su multiplicación. Esta recombinación de dos ADN de diferentes procedencias con el fin de lograr su multiplicación fue la que dio origen a la ingeniería genética.

La figura 3-27 muestra las diferentes etapas comprendidas en la producción de un ADN recombinante. El ADN circular del plásmido se corta con una endonucleasa de restricción, lo que genera en los extremos surgidos del corte sendos tramos de ADN “adhesivos”. Dado que el ADN eucariota se corta con la misma enzima, se generan segmentos de ADN con extremos “adhesivos” idénticos a los del plásmido cortado. En consecuencia, ambos ADN se adhieren por sus extremos, ya que exhiben secuencias de bases complementarias. La soldadura se completa mediante la enzima *ADN ligasa*.

El plásmido con el ADN recombinante se introduce en la bacteria con la simple maniobra de poner a la célula en una solución de cloruro de calcio, lo que la hace permeable al plásmido (fig. 3-27). Dado su papel, el plásmido recibe el nombre de vector. Luego se seleccionan las bacterias que llevan el plásmido mediante el uso de antibióticos. Así, si un plásmido contiene el gen que confiere resistencia a la tetraciclina, en presencia de este antibiótico mueren todas las bacterias cuyos plásmidos no poseen el gen. Una vez que se obtiene la colonia de la bacteria deseada —portando el plásmido en cuestión— se pueden conseguir millones de copias del ADN eucariota incorporado al plásmido (fig. 3-27). Como todas las copias del gen provienen de una sola, esta técnica lleva el nombre de *clonación de genes*.

3-29. Pueden emplearse otras clases de vectores para clonar fragmentos de ADN

Para conseguir la clonación de fragmentos de ADN no solo se emplean plásmidos como vectores. Otro vector usado es el bacteriófago *lambda*, que además pudo ser construido *in vitro* mezclando el ADN del virus con sus proteínas. Así se han construido bacteriófagos que pueden aceptar inserciones de ADN foráneos de 15.000 a 20.000 nucleótidos. Los plásmidos que aceptan moléculas de

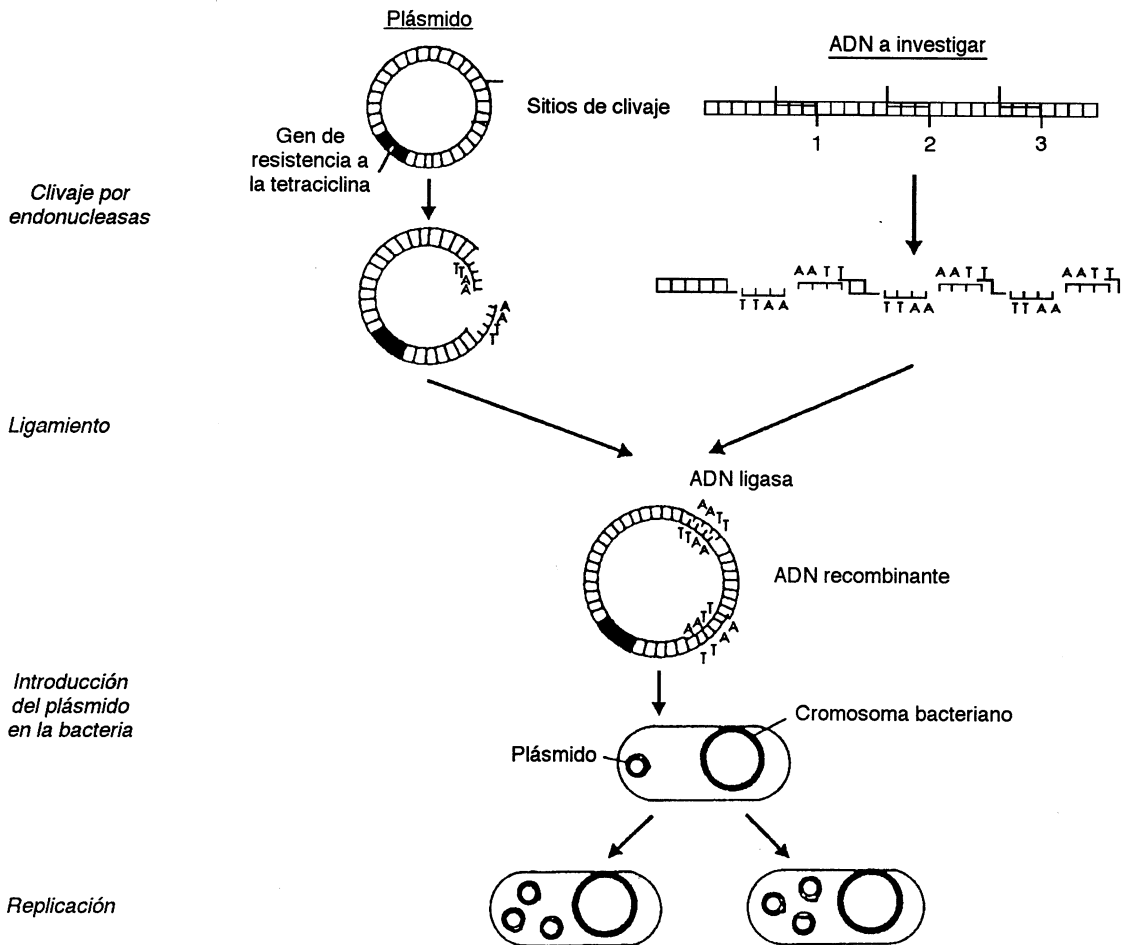


FIG. 3-27. Producción de una molécula de ADN recombinante por ingeniería genética. (Cortesía de S. Cohen; modificado.)

ADN tan largas se multiplican muy poco, de ahí la ventaja que poseen los bacteriófagos.

3-30. Las técnicas de ingeniería genética han permitido construir "bibliotecas de genes" de células eucariotas

La localización, separación y multiplicación de un gen en la célula eucariota puede conseguirse siguiendo los pasos mostrados en la figura 3-28. El proceso comienza con el aislamiento del ADN de varias células, que al ser digerido con enzimas de restricción genera una enorme cantidad de segmentos cortos de ADN, llamados *fragmentos de restricción*. Mediante el procedimiento indicado en la sección 3-28, tales fragmentos son incorporados a vectores —plásmidos, por ejemplo—, de modo que cada vector recibe uno de los fragmentos. Luego los vectores con sus fragmentos de restricción se introducen en bacterias, las cuales son sembradas en medios de cultivo.

La multiplicación de cada bacteria genera una colonia separada de las demás, de modo que en los cultivos se forman miles de colonias. Como consecuencia, cada colonia resulta habitada por un *clon* de bacterias que descienden de un ancestro común. Como es obvio, cada clon contiene un fragmento de restricción diferente. La colección de estos clones, cuyo conjunto posee la totalidad del ADN de las células investigadas, recibe el nombre de "*biblioteca de genes*" o *genoteca*. El fragmento de ADN buscado se encuentra en uno de los "ejemplares" de la biblioteca.

3-31. Se utilizan sondas de ADNc para localizar la colonia de bacterias que contiene el fragmento de ADN que se desea aislar

La técnica más usada para individualizar el clon de bacterias que contiene el ADN buscado se halla resumida en la figura 3-29. Así, sobre el cultivo

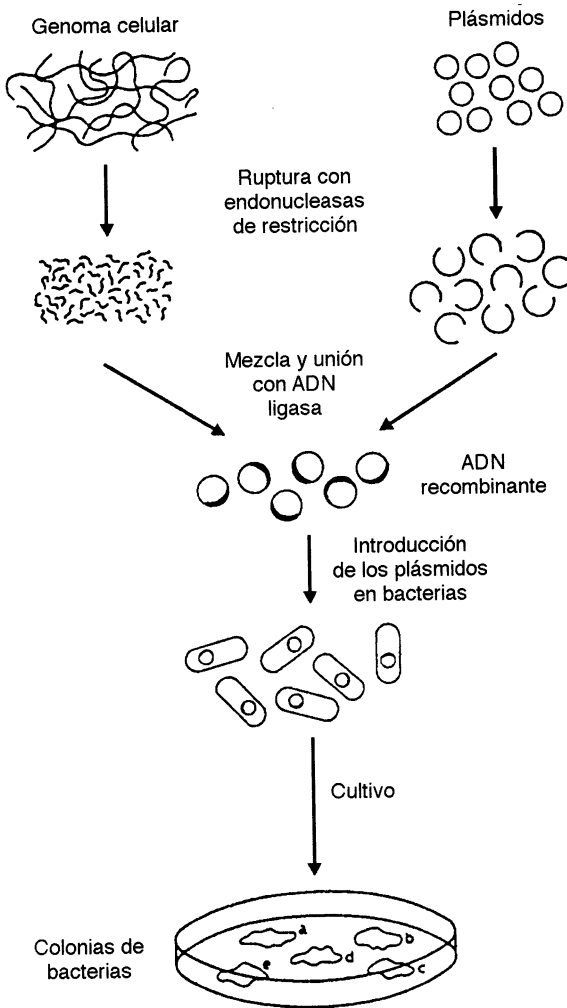


FIG. 3-28. Pasos para la formación de una "biblioteca de genes" o genoteca. (De A. Blanco, 1993.)

sembrado por las colonias de bacterias se coloca un papel de nitrocelulosa, de modo que las colonias se transfieran al papel, lo que forma una réplica del cultivo. A continuación se lisan las bacterias de las colonias y el ADN recogido se desnaturaliza mediante calor (cap. 2-6). Este procedimiento no altera la posición de las moléculas de ADN, que siguen en el papel de nitrocelulosa en los mismos lugares que ocuparon las colonias bacterianas.

La réplica en el papel de nitrocelulosa se incuba con una *sonda de ADN* radiactivo complementario del segmento deseado (ADNc). El lento enfriamiento del papel hace que se hibridice el ADNc radiactivo con el segmento de ADN que se quiere localizar. El próximo paso consiste en colocar sobre el papel de nitrocelulosa una película fotográfica, en la cual quedará impresa —por radioautografía— la posición del ADN buscado. Este dato, al confrontarse el papel con el cultivo, permite identificar la

posición de la colonia portadora del ADN. Si la colonia es resembrada en nuevos medios de cultivo, se consigue un número creciente de bacterias y por ende grandes cantidades del ADN. Para su estudio (su secuenciación, por ejemplo), previa lisis de las bacterias el ADN se extrae de los vectores (plásmidos, etc.) con las endonucleasas de restricción adecuadas.

Debe señalarse que las sondas se obtienen a partir de moléculas de ARN (tomadas de tipos celulares que las fabrican en grandes cantidades), las cuales sirven de moldes para la construcción de los correspondientes ADNc. Como veremos en el capítulo 2-6, ello se logra mediante la enzima transcriptasa inversa. La radiactividad del ADNc se obtiene empleando para su síntesis desoxirribonucleósidos trifosfato marcados con ^{32}P . Las sondas de ADNc pueden también construirse sobre la base de la calidad y disposición lineal de los aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes que se desea identificar.

3-32. Los fragmentos de restricción pueden ser separados por electroforesis y detectados por el método de transferencia del ADN

Los fragmentos de restricción pueden ser separados por *electroforesis* en un gel de agarosa sobre la base de sus tamaños (fig. 3-30). Ello posibilita la localización específica de uno de los fragmentos, para lo cual se comienza tratando al gel con una solución alcalina que desnaturalice las moléculas de ADN, es decir, separe sus dos cadenas. Con el objeto de facilitar la manipulación de las bandas electroforéticas (invisibles para el investigador), éstas son transferidas a un filtro de nitrocelulosa. Para ello el gel se coloca sobre varias hojas de papel empapadas con solución fisiológica, se aplica el filtro de nitrocelulosa sobre el gel, y sobre el filtro se ponen varias hojas secas de papel absorbente. Dado que la solución salina asciende por capilaridad desde las hojas empapadas hacia las secas, arrastra a los fragmentos de ADN contenidos en las bandas del gel, las cuales son transferidas al filtro de nitrocelulosa y quedan localizadas en las posiciones que tenían en el gel.

El filtro —separado del gel y de los papeles usados para la transferencia del ADN— se trata con una sonda radiactiva de ADNc (marcada con ^{32}P), específica para el segmento de ADN que interesa localizar. Tras la hibridación de ambos ADN, el filtro se aplica sobre una película fotográfica, de modo que la o las bandas que contienen el ADN buscado queden impresas en ella (radioautografía). Para localizar los segmentos de ADN en el gel de agarosa, bastará confrontarlo con la película.

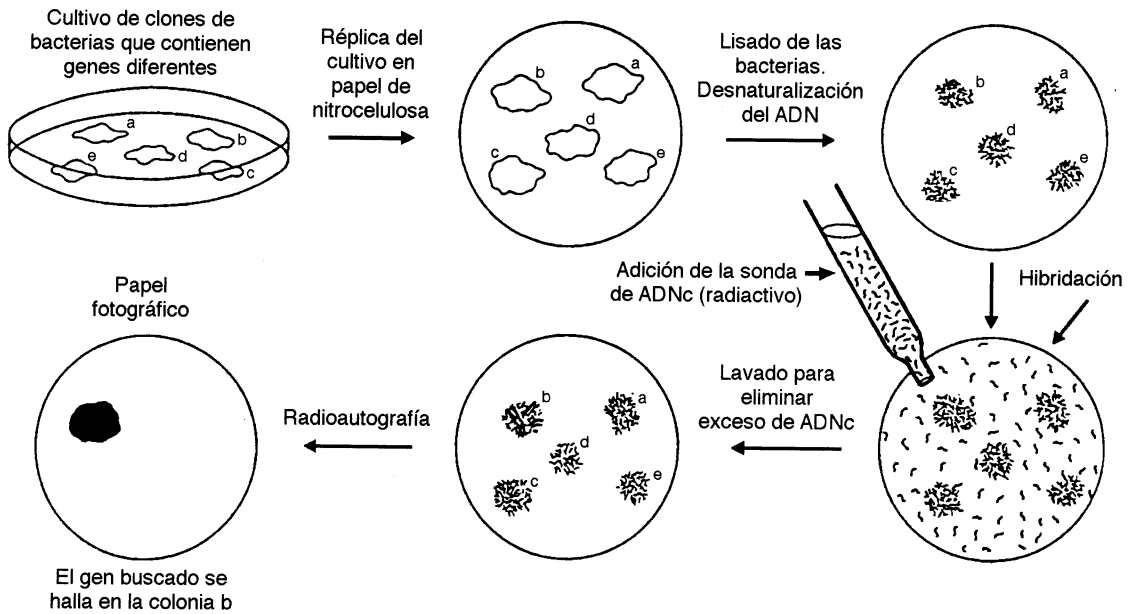


FIG. 3-29. Técnica para individualizar el clon de bacterias que contiene el fragmento de ADN deseado. (De A. Blanco, 1993.)

La *transferencia del ADN* desde el gel de agarosa al filtro de nitrocelulosa lleva el nombre de Southern blotting, en parte por su significado literal (*blotting*, transferencia) y en parte como homenaje al creador del método, E. M. Southern. Existen técnicas semejantes para transferir ARN y proteínas, designadas —no sin humor— Northern blotting y Western blotting, respectivamente.

3-33. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite conseguir grandes cantidades de un segmento de ADN en muy poco tiempo

Hemos visto que las técnicas de clonación permiten conseguir grandes cantidades de un segmento determinado de ADN. No obstante, esas técnicas están siendo reemplazadas por una metodología relativamente nueva —denominada *reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*—, que es un sistema de amplificación *in vitro* del ADN con el que pueden conseguirse en pocas horas grandes cantidades de un gen (o de una parte de él) a partir de muy poco ADN, incluso el aportado por una sola célula. Con esta técnica se evita el uso de endonucleasas de restricción y no es necesario construir moléculas de ADN recombinante.

El procedimiento se halla ilustrado en la figura 3-31. El ADN se desnaturaliza por calentamiento y se agregan dos clases de oligonucleótidos *cebadores*, complementarios de las secuencias situadas en los extremos del tramo de ADN que se desea amplificar. Una vez que los cebadores han encontrado las secuencias complementarias en medio de todo

el ADN celular, se unen a ellas, lo cual es posible porque se hace descender la temperatura del aparato. Seguidamente se construyen las cadenas hijas a partir de los extremos 3' de los cebadores, síntesis que es catalizada por una ADN polimerasa especial —extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*—, resistente a la temperatura usada durante la desnaturalización.

Junto a la enzima se agregan cantidades suficientes de cada uno de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato que componen el ADN. Al concluir el proceso se obtienen dos segmentos de ADN a partir de uno. Dado que se repite la misma operación en cada segmento hijo, al cabo del segundo ciclo se obtienen cuatro de esos segmentos, y así sucesivamente en los ciclos venideros, por lo que el ADN se amplifica en forma exponencial.

3-34. La ingeniería genética ha permitido comprender cómo se expresan los genes

La ingeniería genética ha sido también invaluable para saber de qué manera son controlados los genes en los organismos superiores. En efecto, la cantidad de un gen se hace crecer no solo para analizar su secuencia sino también su comportamiento, lo que se logra luego de su mutación y reincorporación a las células eucariotas.

La mutación se logra mediante diversas manipulaciones en genes clonados en plásmidos (fig. 3-32). Por ejemplo, es posible provocar la delección de varios nucleótidos tratando al ADN con una endonucleasa de restricción, o inducir un cambio en un solo nucleótido por medio de un mutágeno

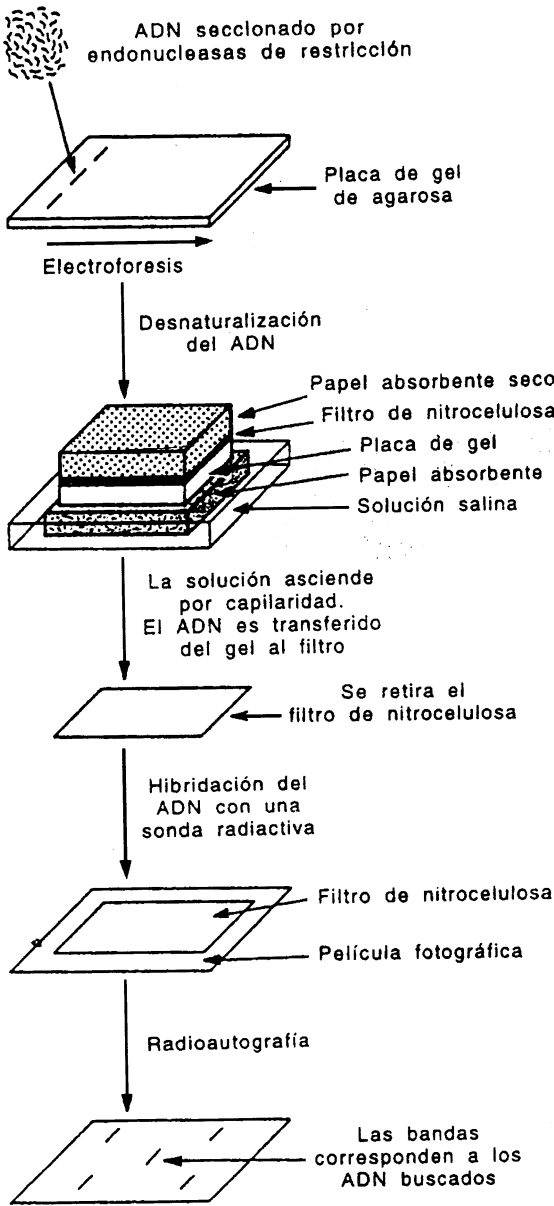


FIG. 3-30. Separación de los fragmentos de restricción mediante el método de transferencia de ADN llamado *Southern blotting*. (De A. Blanco, 1993.)

químico. La mutación se constata mediante el secuenciamiento del ADN afectado. Luego se prueba el efecto biológico de la mutación en células vivas eucariotas, inyectando el gen mutado en el núcleo de éstas y analizando su función. Con este procedimiento pueden determinarse, por ejemplo, las posiciones de las regiones genéticas que codifican las señales de iniciación y de terminación para la síntesis del ARN. Los experimentos de este tipo han sido fundamentales para comprender de qué manera actúan los genes eucariotas. Esta genética se

denomina "inversa" debido a que primero se clona el gen, luego se lo hace mutar y finalmente se prueba su actividad biológica.

Existen muchos tipos de ensayos funcionales con genes clonados. Así, pueden trasplantarse genes en células somáticas cultivadas, las cuales incorporan al ADN desde el medio de cultivo y lo integran a sus genomas (el ADN se agrega al medio precipitado con PO_4Ca_2). Como alternativa, el ADN clonado puede microinyectarse directamente en el núcleo de dichas células. También pueden inyectarse ge-

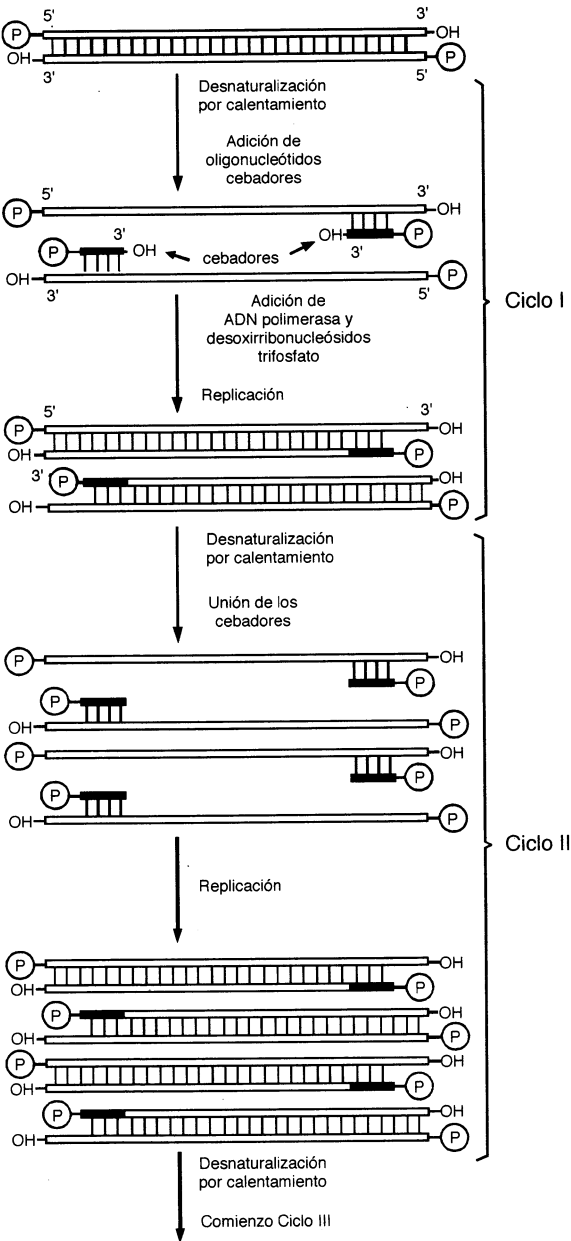


FIG. 3-31. Dos ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (De A. Blanco, 1993.)

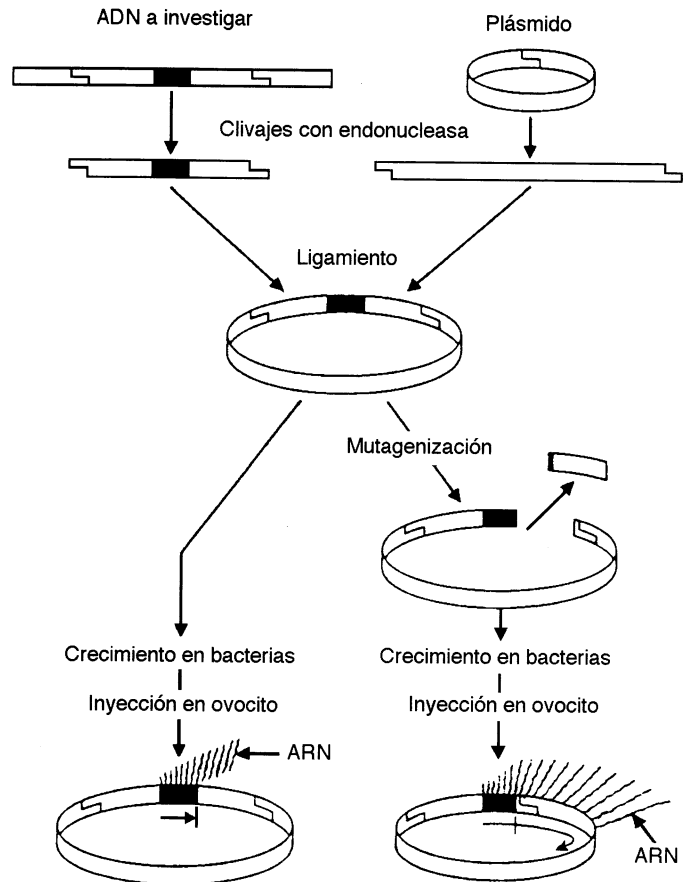


FIG. 3-32. Recombinación de un plásmido con un segmento de ADN que contiene un gen cuya función se desea estudiar. Parte de los plásmidos recombinantes son mutados (en este ejemplo, por la delección de una secuencia de nucleótidos del extremo del gen en estudio). La extensión exacta de la delección puede determinarse por el método de secuenciamiento. Los plásmidos son clonados en bacterias para obtener gran cantidad del gen original (izquierda) y del gen mutado (derecha). Luego son inculados en ovocitos. En este caso el gen original es transcrito en moléculas de ARN de tamaño apropiado. No ocurre lo mismo con el gen mutado, cuya transcripción continúa más allá del extremo del gen, e invade el ADN del plásmido. Es probable que la delección haya anulado la señal de terminación que reconoce la ARN polimerasa.

nes clonados en embriones de la mosca *Drosophila melanogaster* y del ratón, en cuyo caso ingresan a las respectivas líneas germinativas, lo que origina cepas de animales que transmiten a sus progenies los genes recién adquiridos.

3-35. La ingeniería genética ha permitido la producción industrial de importantes proteínas

El ADN recombinante hizo posible el empleo de bacterias para producir proteínas de importancia médica, lo que dio origen a una industria absolutamente nueva. La expresión de los genes eucariotas en las bacterias requiere que se unan a promotores bacterianos adecuados, por lo que debieron construirse genes híbridos, muy difíciles de conseguir. Mediante esta técnica se fabrican vacunas, hormonas (de crecimiento, insulina), etcétera.

3-36. La técnica de hibridación in situ de ácidos nucleicos posibilita el mapeo genético

Muchos genes pueden ser detectados directamente en los lugares que ocupan en los cromosomas mediante el método de *hibridación in situ*. El

experimento consiste en la hibridación del gen que se desea detectar con una molécula de ADN complementario, que además debe llevar un marcador (fluorescente o de otro tipo) para que pueda ser identificado en el tejido o en el extendido.

Esta técnica permitió localizar un gran número de genes humanos; por ejemplo, los genes de los ARN ribosómicos 45S en las constricciones secundarias de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22, y el gen del ARN ribosómico 5S en el extremo del brazo largo del cromosoma 1.

BIBLIOGRAFIA

- Abelson J. and Butz E. (1980) Recombinant DNA. *Science* 209:1317.
- Alexander R. B., Isaacs W. B. and Barrak E. R. (1985) Immunogold probes for electron microscopy: evaluation of staining by fluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 33:995.
- Allen R. D. (1985) New observations on cell architecture and dynamics by video-enhanced contrast optical microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14:265.
- Allshop R. C., Vaziri and Peterson C. (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10114.
- Bancroft J. D. and Stevens A. (1977) *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone.

- Bobrow M. N., Harris T. D., Shaughnessy K. S. and Litt G. J. (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification: application to immunoassays. *J. Immunol. Meth.* 125:279.
- Borlinghaus R. (1995) Microscopy and the third dimension. *Zeiss Information with Jena Review* 4:7.
- Branton D. (1966) Fracture faces of frozen membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55:1048.
- Chu S. (1991) Laser manipulation of atoms and particles. *Science* 253:861.
- Cohen S. N. (1975) The manipulation of genes. *Sci. Am.* 233:24.
- Crewe A. V. (1983) High resolution scanning transmission electron microscopy. *Science* 221:325.
- De Duve C. (1975) Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189:186.
- De Robertis E. M. F. and Gurdon J. B. (1979) Gene transplantation and the analysis of development. *Sci. Am.* 241:74.
- Everhart T. E. and Hayes T. L. (1972) The scanning electron microscope. *Sci. Am.* 226:54.
- Freeman J. A. and Spurlock B. O. (1962) A new epoxy embedment for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 13:347.
- Griffin H. G. and Griffin A. M. (1993) DNA sequencing. Recent innovations and future trends. *Appl. Biochem. Biotech.* 38:147.
- Haber D. A. (1995) Telomeres, cancer and immortality. *N. Engl. J. Med.* 332:955.
- Ham R. C. (1965) Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53:288.
- Herzenberg L. A. and Sweet R. G. (1976) Fluorescence-activated cell sorting. *Sci. Am.* 234:108.
- Howell K. E., Devaney E. and Gruenberg J. (1989) Subcellular fractionation of tissue culture cells. *Trends Biochem. Sci.* 14:44.
- Kessler C. and Manta V. (1990) Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Gene* 92:1 (review).
- Maniatis T. et al. (1978) The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA. *Cell* 15:687.
- Maxam A. M. and Gilbert W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74:460.
- Milstein C. (1980) Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* 243:66.
- Mittal B. and Sanger J. M. (1987) Visualization of miosin in living cells. *J. Cell Biol.* 75:1753.
- Nakane P. K. and Pierce G. B. (1967) Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Cell Biol.* 33:307.
- Nathans D. and Smith H. O. (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 44:273.
- Nelson D. L. (1991) Applications of polymerase chain reaction methods in genome mappings. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1:62.
- Pawley J. B. (1990) *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Plenum Press.
- Pease A. G. E. (1980) *Histochemistry: Theoretical and Applied*, 4th Ed. Churchill Livingstone.
- Penner R. and Heher E. (1986) The patch-clamp technique in the study of secretion. *Trends in Neurosciences* 12 (4):159.
- Pollak R. (1973) *Readings in Mammalian Cell Culture*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Rogers A. W. (1979) *Techniques of Autoradiography*, 3rd Ed. Elsevier.
- Sabatini D. D., Bensch K. and Barnett R. J. (1963) Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17:19.
- Saiki R. K. et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487.
- Sanger F. et al. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* 265:687.
- Shi S., Key M. E., Kalra K. L. (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. An enhanced method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 39:741.
- Southern E. M. (1992) Genome mapping: cDNA approaches. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2:412.
- Spencer M. (1982) *Fundamentals of Light Microscopy*, Cambridge University Press.
- Taylor C. R. and Kledzik G. (1981) Immunohistological techniques in surgical pathology: a spectrum of "new" special stains. *Hum. Pathol.* 12:590.
- Thomas P. S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:5201.
- Trask B. J. (1991) Gene mapping by in situ hybridization. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1:82.
- Warnke R. and Levy R. (1980) Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies. A biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J. Histochem. Cytochem.* 28:771.
- White J. G., Amos W. B. and Fordham M. (1987) An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J. Cell Biol.* 105:41.
- Wischnitzer S. (1981) *Introduction to Electron Microscopy*. Pergamon Press.
- Zermike F. (1955) How I discovered phase contrast. *Science* 121:345.

4 / Membrana celular

Roberto Ponzio

La célula tiene una composición diferente de la del medio que la rodea. Por ejemplo, el contenido iónico de nuestras células es muy diferente del que tiene el plasma o el fluido de las matrices extracelulares. Esta diferencia es mantenida durante toda la vida de la célula, en general con un importante gasto de energía, por una delgada membrana superficial: la *membrana plasmática* o *celular*, que regula el intercambio de iones y moléculas entre la célula y el medio extracelular.

Esta membrana es tan delgada que no puede ser observada con el microscopio óptico, aunque en algunas células se encuentra cubierta por capas externas más gruesas que entran en el límite de resolución del microscopio de luz. Por ejemplo, la mayor parte de las células vegetales tiene una gruesa pared de celulosa que cubre y protege a la verdadera membrana plasmática.

Pese a su extrema delgadez, la membrana celular no solamente determina la composición diferencial entre el citosol y el medio extracelular, sino que, entre otras importantes funciones que iremos estudiando a lo largo de este capítulo y de los siguientes, es el instrumento fundamental mediante el cual las células se comunican entre sí y se relacionan con las matrices extracelulares.

Hasta el advenimiento del microscopio electrónico, los científicos no pudieron apreciar adecuadamente la complejidad de la organización celular, entre cuyos componentes se incluye a la membrana plasmática y a un elaborado sistema de membranas internas que desempeñan una multitud de tareas especializadas. Todas estas membranas poseen una composición química y una arquitectura molecular similares, pero no idénticas. En el capítulo 8 se tratarán las particularidades del sistema de endomembranas. Recuértese por ahora que ciertos conceptos de la membrana plasmática que desarrollaremos a continuación son aplicables a la mayoría de las membranas biológicas.

Los objetivos de este capítulo son estudiar la membrana plasmática desde el punto de vista de

su composición química y la manera como están organizados los diversos tipos moleculares a nivel estructural. Este estudio comprende cierto conocimiento del ensamble de bicapas lipídicas artificiales y los importantes conceptos de fluidez y de asimetría de la membrana. Además se analizarán los diversos tipos de permeabilidad de la membrana celular.

Otras funciones de las membranas, como algunas de las relacionadas con la comunicación, el reconocimiento y las interacciones entre células de un tejido entre sí, y de las células con las matrices extracelulares, constituyen la esencia del capítulo 6.

Por fin, la respuesta de la célula a una multitud de señales químicas del medio extracelular (tales como hormonas, contactos intercelulares, neurotransmisores, factores de crecimiento, moléculas de las matrices y muchas otras) incluye inicialmente la recepción de dichas señales por medio de proteínas receptoras pertenecientes a la membrana. Los mecanismos para la amplificación y transformación de tales señales, con la generación de moléculas de segundos mensajeros que activan las respuestas fisiológicas de la célula (regulando la actividad génica o modificando componentes citoplasmáticos), también residen en la membrana celular. Tales mecanismos serán tratados en detalle en el capítulo 7.

COMPOSICION MOLECULAR DE LAS MEMBRANAS

Para estudiar la composición molecular de la membrana celular, el primer paso consiste en su aislamiento del resto del citoplasma en la forma más pura que sea posible. Luego, la membrana aislada se puede estudiar por métodos bioquímicos y biofísicos. Se han empleado diferentes métodos para aislar membranas plasmáticas de una gran variedad de células, aunque estas preparaciones suelen estar contaminadas con membranas de organoides citoplasmáticos. Por esta razón una buena parte

TABLA 4-1. Relación entre lípidos y proteínas en algunas membranas celulares
(Triggle, 1971)

<i>Tejido y especie</i>	<i>Proteína (%)</i>			<i>Lípido (%)</i>
Mielina del SNC humano	20			79
Mielina periférica de bovino	23			76
Músculo esquelético de rata	65			15
Hígado de rata	60			40
Eritrocito humano	60			40
Mitocondria de hígado de rata	70			27-29

<i>Relación molar</i>				<i>Relación de superficie proteína:lípido</i>
	<i>Aminoácido</i>	<i>Fosfolípido</i>	<i>Colesterol</i>	
Mielina	264	111	75	0,43
Eritrocito	500	31	31	2,00

de los estudios sobre membranas fueron efectuados con las de los eritrocitos, ya que este tipo celular, al carecer de organoides, brinda membranas plasmáticas con alto grado de pureza.

Todas las membranas biológicas, independientemente de su origen, están constituidas por *lípidos* y por *proteínas*. La mayor parte de ellas también poseen *glúcidos* unidos a las proteínas y a los lípidos. Las proporciones en que están presentes estos tres componentes en los diversos tipos de membranas varían enormemente. Los carbohidratos en general representan menos del 10% del total de la masa de la membrana, y aun pueden estar ausentes, como en las membranas mitocondriales internas. En lo que atañe a la relación lípidos/proteínas, en ciertas membranas cerca de las tres cuartas partes del peso están compuestas por estas últimas, mientras que en la mielina, que está formada por las membranas plasmáticas superpuestas de células neurogliales, casi el 80% son lípidos. Los datos de la tabla 4-1 evidencian esta amplia variación entre las diferentes membranas.

En la membrana del eritrocito humano las proteínas constituyen el 52% de su masa, los lípidos el 40% y los hidratos de carbono el 8%. Estos últimos están representados por oligosacáridos unidos a proteínas y a lípidos con los que forman glucoproteínas y glucolípidos, respectivamente.

4-1. Organización molecular de la membrana celular

En un principio, las teorías sobre la estructura de la membrana celular estuvieron basadas en evidencias indirectas. En 1855, Naegeli denominó “membrana plasmática” a una película invisible que en-

volvería a las células y sería la responsable de los fenómenos osmóticos que observó en células vivas. Como las moléculas liposolubles penetran con facilidad a través de la membrana plasmática, en 1902 Overton sostuvo que la membrana plasmática estaría compuesta probablemente por una delgada capa de lípidos, cuyo espesor sería muy inferior al límite de resolución del microscopio óptico. En 1925, Gorter y Grendell propusieron la existencia de una bicapa fosfolipídica al observar que la cantidad de fosfolípidos de la membrana de los eritrocitos era suficiente para formar una doble capa de moléculas sobre toda la superficie celular. Estas teorías también fueron alentadas por mediciones eléctricas que indicaron una alta impedancia a nivel de la membrana plasmática, y por la dificultad que tienen los iones para penetrar una capa lipídica.

Asimismo, se obtuvo información indirecta sobre la estructura molecular de la membrana, indicativa de que también existirían proteínas en ella, a partir del estudio de la tensión superficial de diferentes células. Esta es mucho más baja que a nivel de una interfase agua-aceite pura, y es comparable a la obtenida cuando se agrega una pequeña cantidad de proteína a un sistema lípido-agua.

Para explicar todas estas propiedades, en 1935 Danielli y Davson postularon que la membrana plasmática contenía una bicapa lipídica con proteínas formando capas continuas sobre ambas superficies. Este modelo, aunque incorrecto, pareció confirmarse inicialmente mediante el estudio de sistemas lipídicos artificiales, y años más tarde por la observación con el microscopio electrónico, que mostró por primera vez que todas las células están rodeadas por una membrana plasmática de 6 a 10 nm de espesor. La estructura se repite en todas

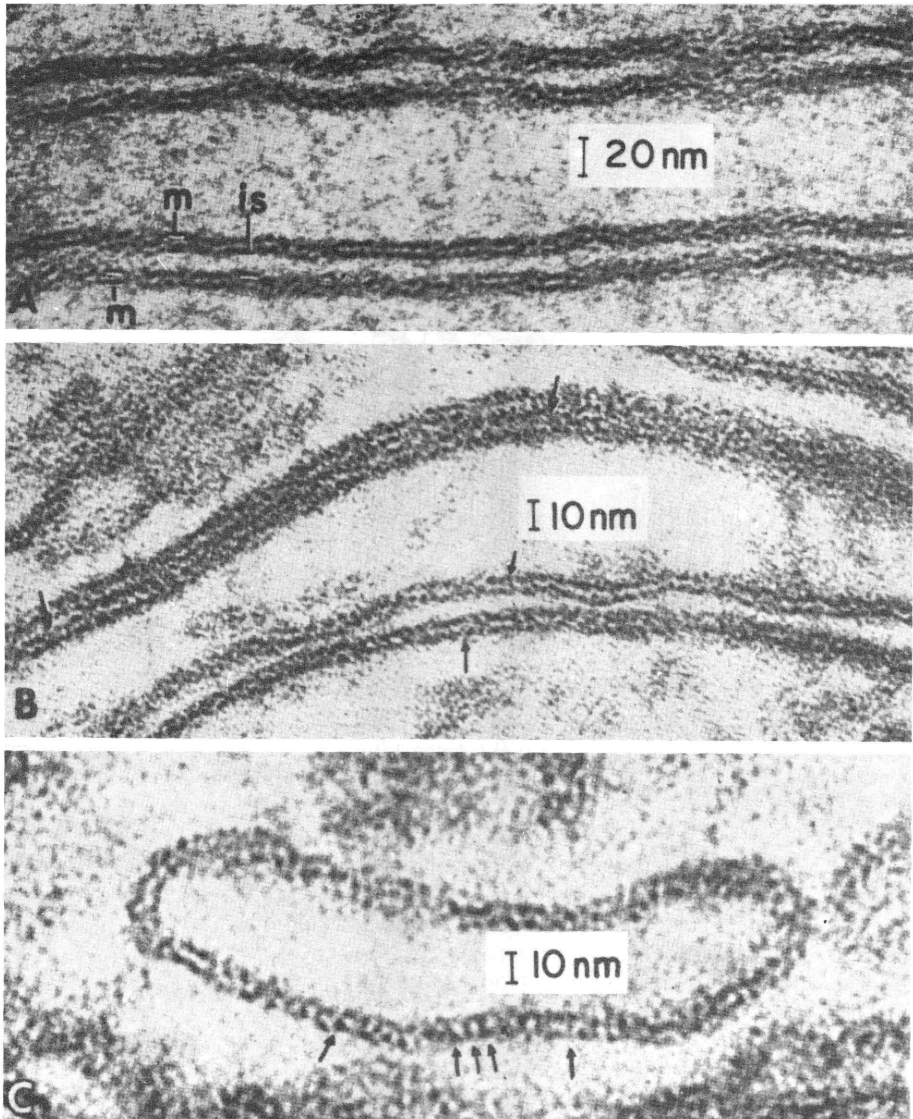


FIG. 4-1. A. Microfotografía electrónica de membranas celulares de células intestinales. *m* pone de manifiesto la estructura constituida por tres capas (unidad de membrana); *is*, espacio intercelular. 240.000 $\times$. B. Membranas celulares de hipotálamo de rata, que muestran la estructura de la unidad de membrana; con flechas se indican algunos detalles finos que atraviesan la membrana. Las flechas superiores señalan una región en la cual las dos membranas parecen estar unidas; hacia la derecha el corte es oblicuo. 360.000 $\times$. C. Lo mismo que B, y además la presencia de puentes finos (flechas) que atraviesan la unidad de membrana. 360.000 $\times$. (De E. De Robertis.)

las membranas biológicas y está constituida por una capa central clara de aproximadamente 3,5 nm, flanqueada a ambos lados por dos capas densas de unos 2 nm (fig. 4-1). Sobre la base de estas observaciones, en 1959 Robertson propuso el modelo que él denominó "*unidad de membrana*", interpretando la imagen microscópica según el modelo de Danielli-Davson, por lo cual se pensó que las líneas densas corresponderían a las supuestas capas proteicas continuas que se creía que estaban adosadas a los lípidos de la bicapa central. Ahora sa-

bemos que esas líneas densas resultan principalmente del depósito de osmio (utilizado como fijador y colorante electrónico) sobre los extremos polares de los fosfolípidos. A principio de la década del sesenta, el método de la congelación-fractura y réplica utilizado en microscopia electrónica (cap. 3-12) hizo accesible el estudio morfológico del interior de la membrana y llevó a una interpretación completamente diferente de su estructura, ya que evidenció la existencia de numerosos glóbulos proteicos dentro del plano de la membrana.

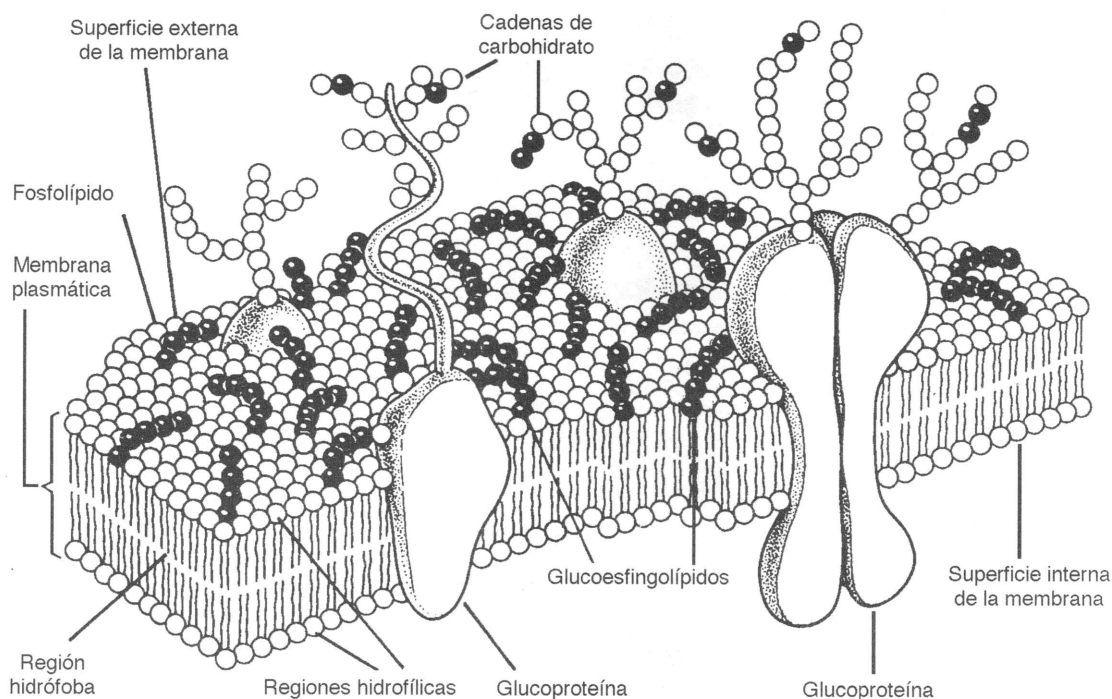


FIG. 4-2. Esquema de la membrana plasmática. En la bicapa lipídica están representadas las moléculas de fosfolípidos y de glucosínglidos (para simplificar, no se esquematizó el colesterol). Las hileras de esferitas son los oligosacáridos de las glucoproteínas que se ven inmersas en la bicapa y de los glucolípidos. Obsérvese que los oligosacáridos se proyectan solamente hacia el espacio extracelular. (De S. Hakomori, modificado.)

En la figura 4-2 está representada la estructura de una membrana ideal, de acuerdo con la concepción actual, de lo que Singer describió, hace más de veinte años, como el “*modelo del mosaico fluido*”, que ha sido firmemente reconocido como la estructura básica de la totalidad de las membranas.

En este modelo los lípidos se disponen en una delgada lámina bimolecular, mientras que las proteínas integrales están insertadas en la capa fluida, de la que emergen hacia ambas superficies. Una propiedad clave de la bicapa es que, aunque constituye una estructura aplanada estable, su fluidez les permite, tanto a los lípidos como a las proteínas, considerables desplazamientos en dicho plano estructural. Las proteínas especializadas cumplen con la mayor parte de las funciones específicas de las membranas, pero la unidad estructural fundamental de toda la membrana biológica es la bicapa lipídica, a la que debe su integridad.

Una de las características importantes de la organización molecular de las membranas es la *asimetría* de todos sus componentes químicos, lo que significa que en ambas mitades de la bicapa los componentes se distribuyen de manera dispar. Esta asimetría es aún más evidente por el hecho de que las cadenas de oligosacáridos hacen saliencia sólo hacia la superficie extracelular de la membrana

plasmática, o hacia el interior del compartimiento de cisternas, vacuolas o vesículas en el caso de las membranas internas.

4-2. Lípidos de la membrana

La composición lipídica varía ampliamente entre las diversas clases de membranas. Los principales son los *fosfolípidos* de diferentes tipos, aunque la mayor parte de las membranas posee también *colesterol*, especialmente en el caso de la membrana plasmática, donde puede representar una cuarta parte o más del total lipídico.

Fosfolípidos. Son moléculas anfipáticas. *Anfipático* es un término de origen griego que significa doble sensibilidad, y en este caso se aplica al doble carácter que presentan estas moléculas, por un lado *hidrofílicas* (polares o afines al agua) y por el otro *hidrofóbicas* (no polares o que repelen el agua). Poseen una denominada “cabeza polar” y dos cadenas hidrofóbicas hidrocarbonadas, generalmente representadas por dos ácidos grasos de longitud variable. Debido a la naturaleza anfipática de los fosfolípidos, en un medio acuoso éstos tienden espontáneamente a agruparse formando micelas o bicapas similares a las celulares.

En los fosfolípidos, el glicerol está conectado por un grupo fosfato con una de varias posibles mo-

léculas hidrofílicas pequeñas (los grupos polares) y con dos ácidos grasos virtualmente en todos los casos. Estos últimos poseen un número par de átomos de carbono que varía comúnmente entre los 16 y los 22. La viscosidad de la bicapa será mayor cuanto más largas sean las cadenas hidrocarbonadas. Otro factor importante que afecta la fluidez es la existencia de dobles ligaduras en las cadenas, ya que los carbonos no saturados imparten una desviación a la cadena que impide que las moléculas se adosen estrechamente y aumenten su viscosidad. Por lo general, en los fosfolípidos de las membranas uno de los ácidos grasos es saturado y el otro no lo es.

La principal diferencia entre los distintos fosfolípidos depende del grupo polar o cabeza hidrofílica. Los más comunes son la etanolamina, la colina y la serina, que forman parte de la cefalina, la lecitina y la fosfatidilserina, respectivamente. La esfingomielina posee colina, pero su alcohol no es el glicerol sino la esfingosina (un aminoalcohol).

A pH neutro los grupos polares de los fosfolípidos no poseen carga eléctrica, con la excepción principal del de la fosfatidilserina, que tiene carga negativa. Otros fosfolípidos menos abundantes, como los fosfoinosítidos, la cardiolipina, el fosfatidilglicerol y los sulfolípidos, también poseen carga negativa, y en su conjunto se denominan fosfolípidos ácidos, a diferencia de los fosfolípidos neutros o no cargados que son la mayor parte. Otros aún más raros pueden poseer carga positiva.

Los diferentes tipos de grupos polares y de ácidos grasos constituyentes determinan la existencia de más de cien tipos diferentes de fosfolípidos en las membranas. Estos no se distribuyen por igual entre ambas hojas de la bicapa, ya que la fosfatidiletanolamina y los fosfolípidos ácidos (cargados negativamente) tienden a ubicarse en la hoja de las membranas en contacto con el citosol, con un intercambio de lípidos prácticamente nulo a través de ambas hojas.

La presencia de estos lípidos cargados en el lado citosólico es de fundamental importancia para comprender los fenómenos de fusión de membranas que ocurren, por ejemplo, en los procesos de exocitosis y endocitosis. Como veremos más adelante, el catión calcio desempeña un papel fundamental en estos procesos, y provoca entre otros fenómenos que estos fosfolípidos cargados negativamente se separen de los demás y se agrupen en regiones en fase de gel, mientras que el resto de la membrana queda muy fluida, enriquecida de fosfolípidos neutros y positivos.

Colesterol. La mayor parte de las membranas biológicas de los eucariotas posee colesterol como componente importante. En particular, la membrana plasmática tiene tantas moléculas de colesterol

como de fosfolípidos, entre las cuales se intercalan. En la mayor parte de los procariotas el colesterol está ausente, y el bajo contenido de este esteroide en las membranas mitocondriales (de alrededor del 4%) tal vez refleje el origen procariótico postulado para las mitocondrias.

Este esteroide anfipático posee una pequeña cabeza polar (el oxhidrilo del carbono 3) dirigida hacia la superficie acuosa, mientras que el resto de la molécula es hidrofóbico y permanece confinado en el interior de la bicapa. El anillo esteroide interactúa con la porción inicial de las cadenas de los ácidos grasos, a las que inmoviliza parcialmente. Esto produce dos importantes efectos: por un lado se incrementa la impermeabilidad de la bicapa a las moléculas hidrofílicas, y por el otro decrece la flexibilidad y fluidez de la membrana a la temperatura central del organismo de 37°C. Pero ante eventuales disminuciones de la temperatura, la presencia de colesterol previene la transición de fase de cristal líquido a gel, como ocurriría si la bicapa fuera enteramente fosfolipídica.

En resumen, el colesterol aumenta la impermeabilidad de la capa bilipídica, aumenta su viscosidad a 37°C y mantiene la fluidez ante una disminución de la temperatura.

4-3. *Proteínas de la membrana*

Las proteínas representan el *componente funcional fundamental* de las membranas biológicas. Desempeñan un importante papel no sólo en la *estructura* de la membrana, sino también en su *permeabilidad*, ya sea como canales o como transportadores. Entre las proteínas de membrana también se encuentran gran número de *enzimas*, de *receptores* para diversas señales, para la *adhesión celular* y para una variedad de funciones específicas que iremos analizando en este y en otros capítulos.

Cada clase de membrana, según su localización en la célula y el tipo celular, posee una dotación proteica específica. Así, la membrana plasmática de una neurona, de un fibroblasto o de un eritrocito ostentan sustanciales diferencias. Aún más marcadas son las diferencias entre el componente proteico de las membranas plasmáticas y el de las membranas internas, como por ejemplo las mitocondriales o las de los discos fotorreceptores de la retina.

Proteínas integrales y proteínas periféricas. Las proteínas de la membrana se han clasificado en integrales (intrínsecas) y periféricas (extrínsecas) de acuerdo con su grado de asociación a ella (tabla 4-2).

Las *proteínas integrales* son en su mayoría *transmembranas*, vale decir que parte de su molécula permanece confinada en el espesor de la bicapa lipídica, con dos dominios que se proyectan por lo

TABLA 4-2. Criterios para diferenciar proteínas de membrana periféricas e integrales (Singer)

Propiedad	Proteína periférica	Proteína integral
Requerimientos para su extracción	Tratamientos suaves	Tratamientos enérgicos: detergentes, solventes orgánicos
Asociación con lípidos en solución	Generalmente carece de lípidos	Generalmente está asociada con lípidos
Solubilidad	Soluble en soluciones acuosas	Generalmente insoluble en soluciones acuosas
Ejemplos	Citocromo C Espectrina	Enzimas fijas a la membrana Antígenos de histocompatibilidad Receptores hormonales y sinápticos

general hacia ambas superficies. Casi invariablemente, las proteínas transmembranas son *glucoproteínas*.

En algunos casos las proteínas integrales no son transmembranas, pero están unidas de forma covalente a los lípidos de membrana del lado citosólico o del extracelular, en especial al glucosil fosfatidil inositol o a grupos isoprenoides. Las proteínas integrales, que representan más del 70 % del total, permanecen tenazmente ancladas a la bicapa tanto durante su vida en la célula como cuando se intenta aislarlas para su estudio; para obtenerlas se requieren tratamientos enérgicos como la aplicación de detergentes o solventes orgánicos que destruyen la integridad de la membrana (fig. 4-3). En ocasiones, la acción de algunas fosfolipasas celulares puede desprender de sus enlaces lipídicos a

ciertas proteínas integrales no transmembranas, las que podrían así quedar libres en el citosol. Este hecho llevó a algunos investigadores a considerar como proteínas intrínsecas solamente a las transmembranas, pese a existir numerosos ejemplos (como el caso de la proteína *ras*) de anclajes sumamente estables.

Para comprender mejor el modo en que las proteínas transmembranas se mantienen insertadas en el espesor de la membrana, se debe recordar que como resultado del plegamiento proteico, en las proteínas extrínsecas (que son hidrosolubles) los aminoácidos hidrofílicos quedan expuestos a la superficie de la molécula, en contacto con el medio acuoso extracelular o con el del citosol, mientras que los hidrofóbicos permanecen ocultos en el interior del plegamiento. En las proteínas transmem-

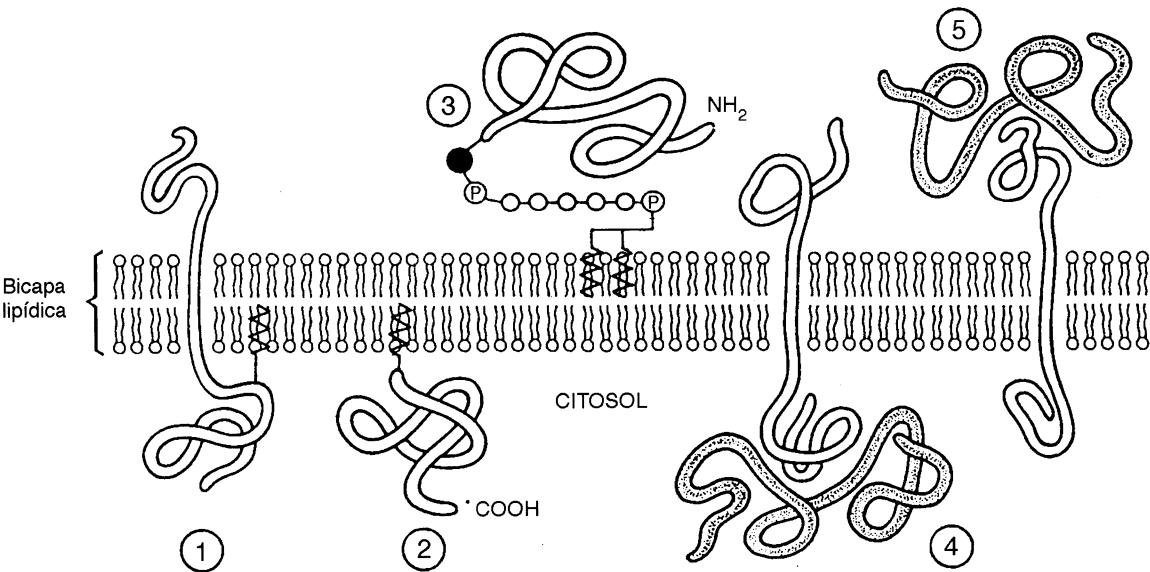


FIG. 4-3. Diferentes modos en que las proteínas de membrana se pueden asociar a la bicapa. (1) es una proteína transmembrana; (2) es una endoproteína y (3) una ectoproteína intrínseca; pese a no ser transmembranas, están firmemente unidas a la bicapa por enlaces fuertes de tipo covalente; (4) y (5) (en gris) son proteínas extrínsecas asociadas por uniones débiles a los dominios citosólico y extracelular de la membrana, respectivamente.

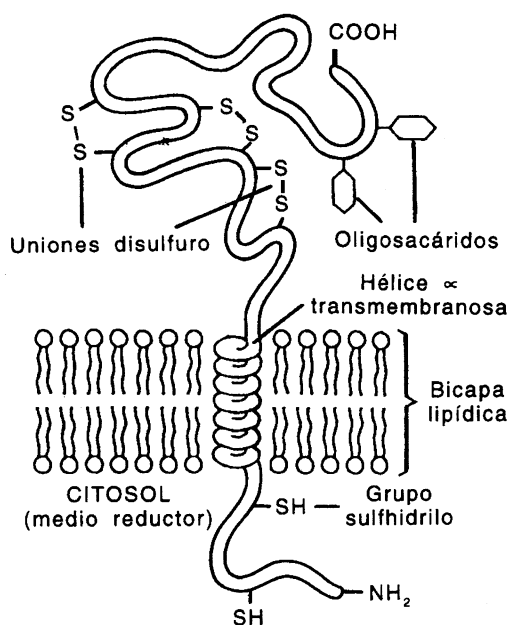


FIG. 4-4. Esquema de una glucoproteína transmembranosa típica, de paso único, del tipo de la glucoforina. En el espesor hidrofóbico de la bicapa se ubican las secuencias de aminoácidos no polares.

branas, por el contrario, los aminoácidos hidrofóbicos están más expuestos en la superficie de la molécula, por lo que deben permanecer en el interior de la bicapa fosfolipídica, donde las interacciones hidrofóbicas con los ácidos grasos los mantienen en su sitio, mientras que sólo las partes hidrofílicas asoman al medio acuoso de ambas superficies de la membrana (fig. 4-4). Por poseer dominios hidrofóbicos e hidrofílicos se considera que estas proteínas son moléculas anfipáticas. Existen proteínas transmembranosas de paso único y de paso múltiple; en este último caso la cadena polipeptídica cruza la bicapa varias veces (fig. 4-5). Además, las proteínas transmembranosas pueden

desarrollar enlaces iónicos con las cabezas polares de los fosfolípidos y quizás ambos mecanismos contribuyan a la estabilidad de su posición.

Las proteínas *extrínsecas* o *periféricas* no penetran en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica (no son transmembranosas) y se asocian con la membrana mediante interacciones débiles, del tipo de las uniones iónicas u otras, tanto con las proteínas integrales como con las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos, del lado citosólico o del extracelular. Cumplen con sus funciones en la membrana o cerca de ésta, y algunas pueden disociarse de la membrana en ciertas condiciones de la actividad celular. Esto se refleja en que para su aislamiento bioquímico son fácilmente separables con procedimientos suaves, como soluciones salinas concentradas, pH elevado o agentes quelantes de cationes bivalentes.

Asimetría de las proteínas. Cada tipo de proteína de membrana posee una determinada *orientación* en dicha estructura. Esta asimetría otorga características diferentes a ambas superficies de las membranas. El caso más evidente tal vez lo constituyan las glucoproteínas; en la inmensa mayoría de éstas, los oligosacáridos están orientados hacia el medio extracelular (o hacia su equivalente topológico, que como ya vimos lo constituye el interior del sistema de endomembranas). Existen unas pocas excepciones, como ciertas glucoproteínas de los complejos de poros nucleares, cuyos glúcidos se proyectan hacia la superficie citosólica.

Es importante tener en cuenta que las proteínas, si bien pueden rotar sobre su eje y moverse lateralmente, no cambian de posición dentro de la bicapa, vale decir que no pueden volverse de modo que el dominio externo pueda pasar a ser citosólico, y viceversa.

En las membranas plasmáticas se han descrito decenas de enzimas, y para cada una de ellas su sitio activo reside constantemente en una determinada cara de la membrana. Por ejemplo, en la cara

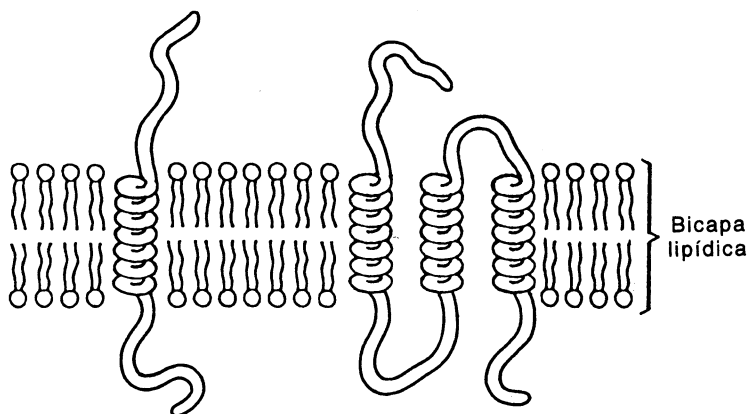


FIG. 4-5. Las proteínas transmembranosas pueden ser de paso único (izquierda) o multipaso. En el ejemplo de la derecha el péptido cruza la bicapa tres veces, plegado en hélice α .

extracelular se halla la actividad de acetilcolinesterasa, la disacaridasa en los enterocitos, y los sitios de unión al potasio y al digitálico para el caso de la bomba de sodio-potasio. En la superficie membranosa citosólica se puede encontrar el dominio ATPásico de la bomba de sodio-potasio, la adenilato ciclasa y la actividad quinásica de los receptores transmembranosos, entre otros muchos ejemplos.

Para el caso de las proteínas de las membranas internas, tales como la glucosa 6-fosfatasa del retículo endoplasmático, la ATP sintetasa de la mitocondria o la bomba protónica de los endosomas, la orientación asimétrica también es un requerimiento absoluto.

4-4. Glúcidos de la membrana

Los hidratos de carbono de las membranas biológicas se presentan en forma de *oligosacáridos*, o menos frecuentemente de monosacáridos, unidos en forma covalente a lípidos (*glucolípidos*) o a proteínas (*glucoproteínas*) de membrana. En ambas moléculas el compuesto hidrocarbonado es semejante o idéntico.

Otros componentes glucídicos de las membranas celulares son los *glucosaminoglucanos* (GAGs) unidos a las proteínas (proteoglucanos). Los GAGs son polímeros lineales de subunidades de disacáridos, de los cuales uno por lo menos es un aminosacárido. Los distintos disacáridos determinan la existencia de diversos tipos de GAGs, algunos de los cuales son ácidos o sulfatados.

Contribuyendo significativamente a la asimetría de las membranas, los glúcidos se ubican casi en

forma exclusiva en la hoja superficial de la membrana plasmática y en su equivalente topológico, que es la monocapa interior del sistema de endomembranas. La abundancia de glucolípidos es, con todo, mucho mayor en la membrana plasmática que en los componentes endomembranosos, y lo mismo puede decirse para las glucoproteínas. Los proteoglucanos son casi exclusivos de las membranas plasmáticas.

La mayor parte de los glucolípidos de las células animales, o *glucoesfingolípidos*, poseen dos cadenas hidrofóbicas: una de ácido graso y la otra de esfingosina. Como en el caso de la esfingomielina, la molécula resultante se denomina ceramida. Esta permanece confinada en el interior hidrofóbico de la hoja externa de la bicapa, y hacia el exterior hidrofílico se ubica un componente glucídico variable, unido covalentemente a la esfingosina. Tanto la ceramida como los carbohidratos presentan gran variedad estructural, en especial estos últimos. En los cerebrósidos, que son los glucolípidos más simples, el glúcido puede ser un solo monosacárido como la glucosa o la galactosa, pero en forma característica los glucolípidos poseen una enorme variedad de oligosacáridos que difieren en longitud, ramificaciones, clases de monosacáridos y tipos de uniones entre éstos. En el caso de los gangliósidos, que son los glucolípidos más complejos, uno de los componentes constantes de los oligosacáridos que se proyectan hacia el espacio extracelular es el *ácido siálico* o *N-acetilneuramínico* (NANA), lo que imparte a la cubierta celular de la que forman parte una carga negativa que tiende a atraer cationes del medio hacia la superficie de la membrana.

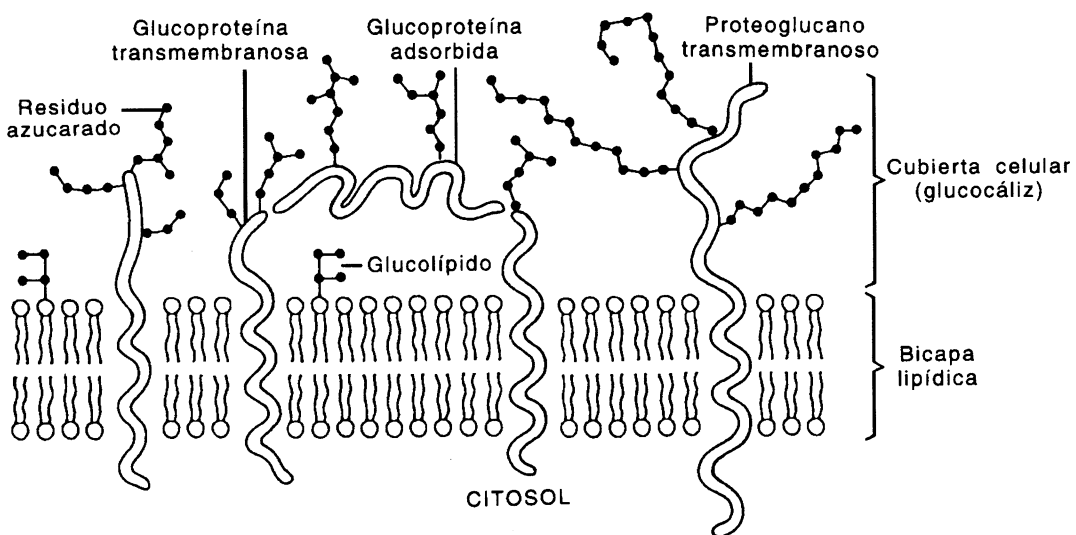


FIG. 4-6. Esquema de cubierta celular o glucocáliz. Los círculos negros representan a los diferentes monosacáridos de los oligosacáridos de glucoproteínas y glucolípidos.

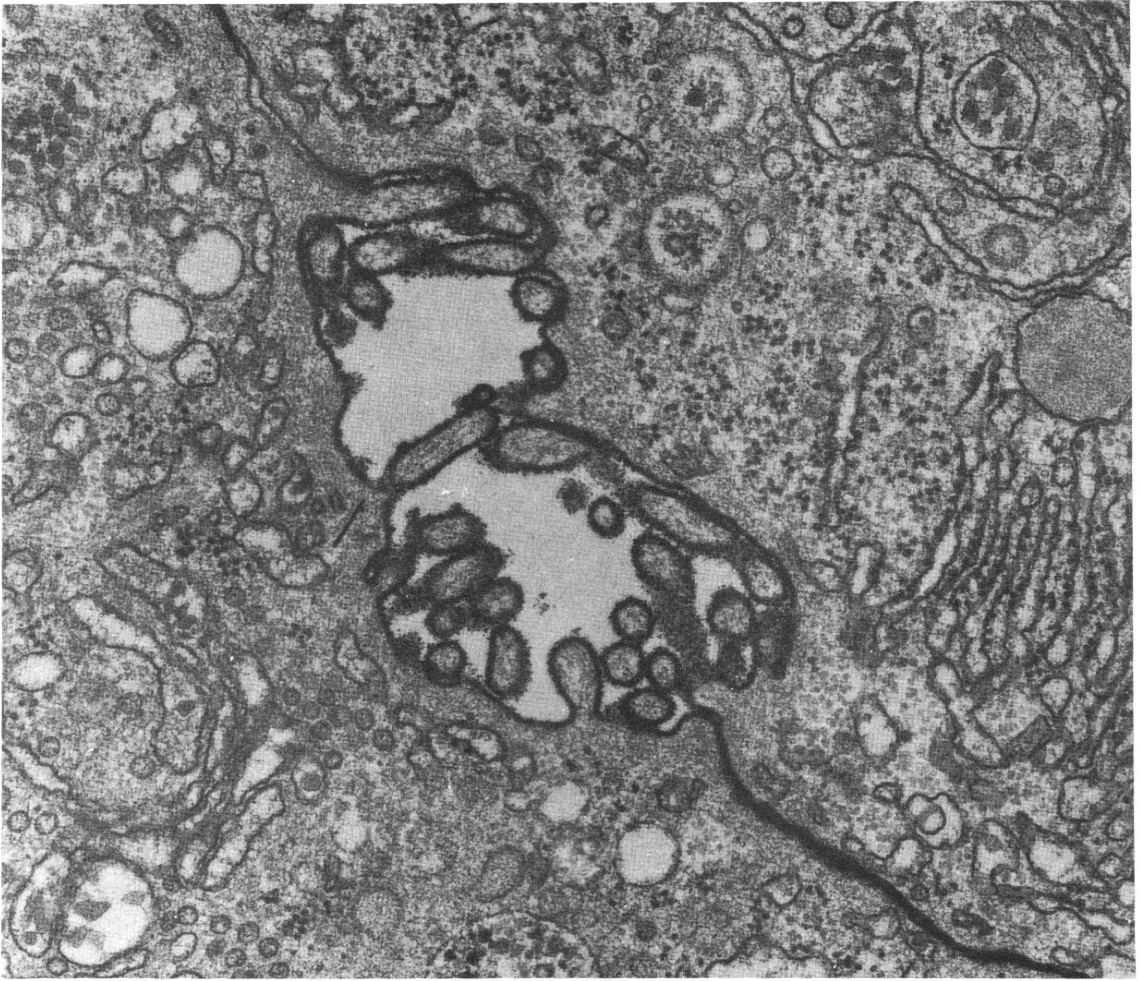


FIG. 4-7. Microfotografía electrónica de un canalículo biliar coloreado con nitrato de lantano para aumentar la densidad electrónica del glucocáliz. El material denso se observa en las membranas de los dos hepatocitos contiguos y bordeando las membranas de las microvellosidades que se proyectan hacia la luz del canalículo. 38.400 $\times$. (Cortesía de D. Ferreira.)

Cubierta celular o glucocáliz. Las células proyectan hacia su superficie externa el componente oligosacárido de sus glucolípidos y glucoproteínas intrínsecos, junto con las cadenas de glucosaminoglucanos de los proteoglucanos integrales. En algunos tipos celulares también se pueden adsorber glucoproteínas y proteoglucanos que fueron secretados hacia el espacio extracelular.

El conjunto de todas estas moléculas forma una cubierta celular denominada *glucocáliz*, de espesor variable pero presente en todas las células (fig. 4-6). En la mayor parte de éstas su grosor, de 10 a 20 nm, se halla por debajo del límite resolutivo del microscopio óptico, y aun en las preparaciones convencionales de microscopía electrónica apenas se aprecia como delicados filamentos ramificados que parten de la unidad de membrana. Sin embargo, su naturaleza polianiónica le permite unirse ávi-

damente a componentes como la ferritina cationizada o el rojo rutenio, que son visualizables con el microscopio electrónico por su alta opacidad (fig. 4-7).

Su afinidad selectiva por diversos tipos de lectinas marcadas con fluorocromos o con peroxidasa permite también la identificación de sus componentes con el microscopio de fluorescencia o de campo claro.

En unos pocos tipos celulares, como los enterocitos, el glucocáliz posee un espesor excepcionalmente grande. En este caso la microscopía electrónica muestra un notable desarrollo de largos filamentos ramificados que parten de la membrana de las microvellosidades de ese epitelio. Este glucocáliz especial se puede identificar con el microscopio óptico por su intensa tinción con la reacción del PAS.

A la cubierta celular se le atribuyen diversas funciones:

1) *Microambiente*. El glucocáliz puede modificar la concentración de diferentes sustancias a nivel de la superficie celular, no sólo como una posible *barrera para la difusión*, sino también porque su *naturaleza polianiónica* es susceptible de afectar el ambiente catiónico extracelular en la vecindad de la célula. En efecto, la membrana plasmática de una célula excitable como la muscular está rodeada por un glucocáliz capaz de atrapar cationes sodio, los cuales, al abrirse los canales iónicos correspondientes, pueden penetrar rápidamente en la célula.

2) *Enzimas*. Las técnicas histoquímicas demuestran la presencia de fosfatasa alcalina en la cubierta celular, relacionada con fenómenos de permeabilidad. En el grueso glucocáliz de las microvellosidades de los enterocitos reside la actividad enzimática digestiva terminal de hidratos de carbono y de proteínas (disacaridasas y oligopeptidasas).

3) *Protección celular*. En ciertas ocasiones la cubierta celular podría proteger a la membrana contra el daño químico o mecánico, y contribuir a mantener a distancia a ciertas moléculas o células.

4) *Reconocimiento celular*. Es la propiedad más importante que le confiere el glucocáliz a la superficie celular. En el capítulo 6, al tratar las interacciones celulares, veremos el papel fundamental de los oligosacáridos en los procesos de *reconocimiento y adhesión celular*, entre otras importantes funciones.

4-5. Modelos artificiales de membranas

Recordemos que, debido a su naturaleza anfipática, en un medio acuoso los fosfolípidos del tipo de los de las membranas biológicas tienden espontáneamente a formar bicapas. De esta manera es posible obtener membranas fosfolipídicas artificiales *planas* o cerradas en forma de *liposomas* (fig. 4-8), en las cuales los fosfolípidos exponen sus cabezas polares al contacto con el agua mientras que ocultan sus cadenas no polares en el interior de las membranas, donde se estabilizan por interacciones hidrofóbicas.

Se puede utilizar una bicapa fosfolipídica sintética (a la que se llama "membrana negra") que cierre un pequeño orificio en una lámina que separa dos cámaras con agua, para estudiar muchas de sus propiedades biofísicas (por ejemplo, resistencia eléctrica, permeabilidad, etc.). También es posible introducir proteínas y otras sustancias en estas membranas.

El tipo de disposición de las moléculas de fosfolípidos en agua depende en realidad de muchos factores, que a su vez dependen de la forma de sus moléculas. Por ejemplo, los fosfolípidos neutros (que constituyen la mayor parte de los fosfolípidos de las membranas) suelen poseer moléculas cilíndricas que tienden a formar bicapas. Por otro lado, los lisofosfolípidos (fosfolípidos a los que se les ha extraído un ácido graso) tienen moléculas de forma cónica que tienden a agruparse en *micelas* (peque-

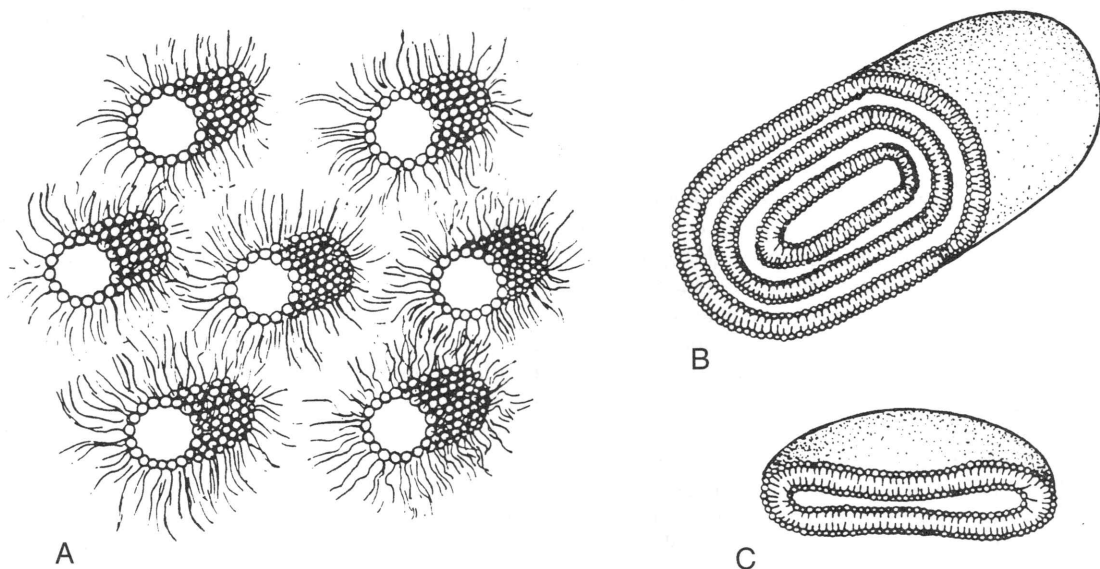


FIG. 4-8. Diferentes tipos de sistemas artificiales de fosfolípidos en medio acuoso. **A**. Fase hexagonal de un fosfolípido hidratado parcialmente. Obsérvese que el agua se halla dentro de cilindros, en contacto con sus grupos polares. Las cadenas hidrofóbicas se proyectan hacia afuera de los cilindros. **B**. Mesofase multicapa o liposoma multicapa. El agua está entre las bicapas lipídicas. **C**. Vesícula fosfolipídica o liposoma simple, con la estructura de una bicapa simple cerrada de 2 nm. (Cortesía de A. B. Bangham y D. A. Haydon.)

ñas gotitas dispersas en agua) con los grupos polares en contacto con el medio acuoso (fig. 4-9).

Por su parte, los fosfolípidos ácidos y los que poseen ácidos grasos poliinsaturados también presentan moléculas cónicas, pero con la cabeza polar más pequeña que el resto de la molécula, por lo que constituyen en agua la llamada *fase hexagonal*, caracterizada por la formación de cilindros fosfolipídicos con el agua contenida en su interior, en contacto con las cabezas polares. Esta configuración también puede inducirse mediante el agregado de calcio. La transición de bicapa a fase hexagonal es importante en ciertos procesos de fusión de membranas, como en la exocitosis y otros (fig. 4-11).

En el capítulo 8 se describe que el aumento de la concentración de calcio en las proximidades de las membranas desempeña un papel fundamental en los procesos de fusión de membranas de las vesículas secretorias, con agrupación de fosfolípidos ácidos y generación de lisofosfolípidos por la activación de fosfolipasas.

Los liposomas poseen muchas propiedades afines a las de las membranas biológicas, y su manipulación es fácil. En la construcción de liposomas se pueden variar a voluntad sus componentes lipídicos, se pueden insertar proteínas en sus membranas (proteoliposomas) y en el medio acuoso de sus cavidades se pueden incorporar sustancias disueltas, incluso medicamentos, por lo que además de su amplia utilización en estudios sobre sistemas de membranas, son vehículos potencialmente útiles para el transporte hacia las células de determinado tipo de drogas.

FLUIDEZ DE LAS MEMBRANAS: SU IMPORTANCIA BIOLOGICA

El concepto de fluidez de las membranas hace referencia al hecho de que tanto los lípidos como las proteínas pueden tener una considerable libertad de movimiento lateral dentro de la membrana.

Ya vimos que la fluidez de la membrana es una propiedad de los fosfolípidos. Normalmente éstos son líquidos a la temperatura corporal. Como es sabido, la disminución de la temperatura tiende a que las membranas pasen de su estado líquido al estado rígido cristalino (gel). A una determinada temperatura, el principal factor que influye sobre la fluidez es el *largo* de la cadena de los ácidos grasos y su *saturación*. Los insaturados (es decir, los que contienen enlaces dobles o triples) tienen un punto de fusión inferior al de los saturados. El colesterol, por su parte, tiende a aumentar la rigidez, y el mismo efecto es ocasionado, hasta cierto punto, por la presencia de proteínas transmembranosas.

	Micelar	Bicapa	Hexagonal
Fase			
Forma molecular			
Lípidos	Detergentes Lisofosfolípidos	Fosfatidilcolina Esfingomielina Fosfatidilserina	Cardiolipina Ácido fosfatídico

FIG. 4-9. Esquema que muestra de qué manera influyen la forma molecular de los lípidos y los extremos polares y no polares en el tipo de fase que se produce (micelar, bicapa o hexagonal).

La fluidez de la capa bilipídica es la responsable del proceso de *autosellado* que presentan las células. Así, es posible introducir una fina micropipeta de vidrio en el interior de una célula con el fin de inyectar una sustancia, efectuar mediciones o bien con otros propósitos, y al retirar la micropipeta el pequeño orificio en la membrana se cierra por sí mismo.

Los fosfolípidos tienen una gran libertad de movimientos dentro de su monocapa: pueden girar velozmente sobre su eje, difundir lateralmente a una velocidad superior a 1 μm por segundo, o balancear y flexionar sus cadenas hidrocarbonadas. En cambio, la inversión o el traslado desde una de las monocapas hacia la otra están severamente restringidos.

A pesar de su alta velocidad de difusión lateral, los fosfolípidos en general no se alejan mucho más de 0,5 a 1 μm en el plano de la membrana.

En cuanto a los movimientos de las proteínas, éstas también pueden girar sobre su eje y desplazarse lateralmente. Como en el caso de los fosfolípidos, tampoco pueden voltearse dentro de la bicapa para cambiar de orientación o de posición. La mayor parte de las proteínas de la membrana posee movimientos de difusión laterales, pero éstos están lejos de ser irrestrictos, ya que hay factores que los limitan (véase más adelante).

Existen numerosos procesos fisiológicos que dependen de la movilidad de las proteínas en el plano fluido de la bicapa. Entre éstos, podemos citar procesos de transporte, agrupamiento de receptores transmembranosos o su interacción con proteínas G en respuesta a un estímulo, la adhesión y fusión de membranas en la endocitosis-exocitosis, o la actividad de enzimas membranas. A modo de ejemplo, entre estas últimas la actividad de la

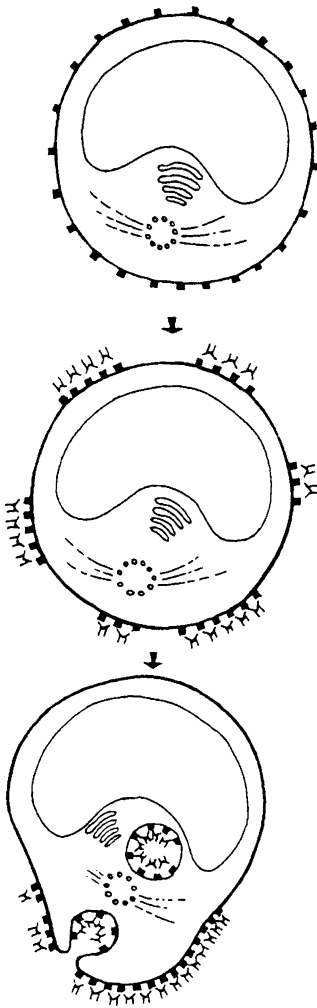


FIG. 4-10. Esquema que representa el fenómeno del capuchón (*capping*) en linfocitos. **Arriba**, distribución normal de los receptores en la superficie celular. En el **centro**, los receptores se hallan ahora agrupados después de su interacción con un anticuerpo bivalente, que se une a ellos y los conecta entre sí (placas). **Abajo**, los grupos de receptores se han dirigido a uno de los polos determinados por el centrosoma. Obsérvese que la membrana se va internalizando por endocitosis. (De S. De Petris y M. C. Raff.)

calcio-ATPasa del retículo sarcoplasmático se incrementa con el grado de rotación de la enzima sobre su eje longitudinal, perpendicular al plano de la membrana. Este movimiento rotacional, a su vez, es función del grado de fluidez de la membrana.

La fundamental importancia de una fluidez correcta de las membranas explica que la evolución haya preservado los mecanismos necesarios para mantenerla dentro de niveles relativamente constantes. En el caso de los procariotas, se ha demostrado que cuando crecen a bajas temperaturas sus fosfolípidos son más insaturados que cuando lo ha-

cen a temperaturas más altas. Este mantenimiento de una fluidez constante en circunstancias desfavorables se denomina *adaptación homeoviscosa* y no es exclusivo de las bacterias, ya que en los animales o vegetales sometidos a procesos de aclimatación a temperaturas diversas se observaron cambios semejantes. En los animales hibernantes, durante la fase de sueño en que la temperatura corporal desciende más de diez grados, la fluidez se mantiene por cambios en los ácidos grasos. Estos incluyen la metilación de la fosfatidiletanolamina por medio de metiltransferasas de la membrana, que a su vez pueden estar reguladas por receptores.

4-6. Estudios experimentales de la fluidez

Existen experimentos clásicos, demostrativos de la naturaleza fluida de las membranas plasmáticas.

En uno de ellos, si los linfocitos B son puestos en contacto con anticuerpos fluorescentes capaces de unirse específicamente a moléculas receptoras de su superficie, es posible observar el *fenómeno del capuchón*. Las moléculas se desplazan visiblemente en la membrana para formar placas (fig. 4-10) que luego se aglomeran en un polo de la célula (*capping*) y originan un capuchón intensamente fluorescente. En este punto la porción de la membrana que contiene el marcador se internaliza por endocitosis. Este proceso, que hace que la membrana del linfocito se vea desprovista de receptores durante varias horas, ocurre probablemente en el organismo cuando un linfocito B se une a un exceso de antígeno. Todo el proceso puede ser inhibido haciendo descender la temperatura, lo cual ocasiona que la membrana se solidifique.

El otro experimento clásico relacionado con estos fenómenos es el de Frye y Edidi, en el cual se fusionan dos tipos diferentes de células, una de ratón y la otra humana, que por supuesto poseen proteínas superficiales diferentes. La *fusión celular* se puede conseguir por varios métodos, uno de ellos mediante la influencia del virus Sendai, que facilita la fusión de las membranas plasmáticas de ambas células, cuyos citoplasmas se mezclan a la vez que se forma un heterocarion con dos núcleos (fig. 4-11). Si originariamente se marcaron las células con anticuerpos fluorescentes de diferentes colores (como la fluoresceína, verde, y la rodamina, roja), en un comienzo es posible reconocer en el heterocarion las dos partes de la membrana correspondientes a cada una de las células originales. Sin embargo, al dispersarse y mezclarse las proteínas en el plano fluido de la membrana no es tan fácil reconocer separadamente ambos colores, y luego de 40 minutos ya no es posible diferenciarlos en absoluto. También en este caso las temperaturas por debajo de 20°C impiden esta fusión y mezcla,

porque causan la solidificación de la bicapa lipídica.

Los movimientos de difusión de proteínas en el plano fluido de las membranas también se pueden cuantificar mediante técnicas físicas (cuyo estudio escapa al interés de este libro) o biológicas.

Los métodos biológicos incluyen el uso del microscopio, y con ellos se pueden efectuar estudios muy precisos sobre el movimiento molecular en las membranas empleando varias técnicas.

Una es la *recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueo* (FRAP), que consiste en marcar proteínas u otros componentes de la membrana con colorantes fluorescentes, para luego destruir irreversiblemente (fotoblanquear) a los fluorocro-

mos en una pequeña área de la membrana mediante un intenso pulso láser. La fluorescencia va retornando a la zona blanqueada en la medida en que una fracción de las proteínas marcadas pueda difundirse desde los laterales no irradiados.

Otro método, el *rastreo de partículas aisladas* (SPT), consiste en marcar específicamente una determinada molécula membranosa con una partícula fluorescente o de oro coloidal recubierta por anticuerpos. Los desplazamientos de proteínas individuales pueden seguirse mediante microscopía de imagen digital, con precisión de nanómetros.

Por último, las proteínas se pueden unir a microesferas que se manipulan mediante "pinzas ópticas" o *trampas de láser*. Desplazando la trampa

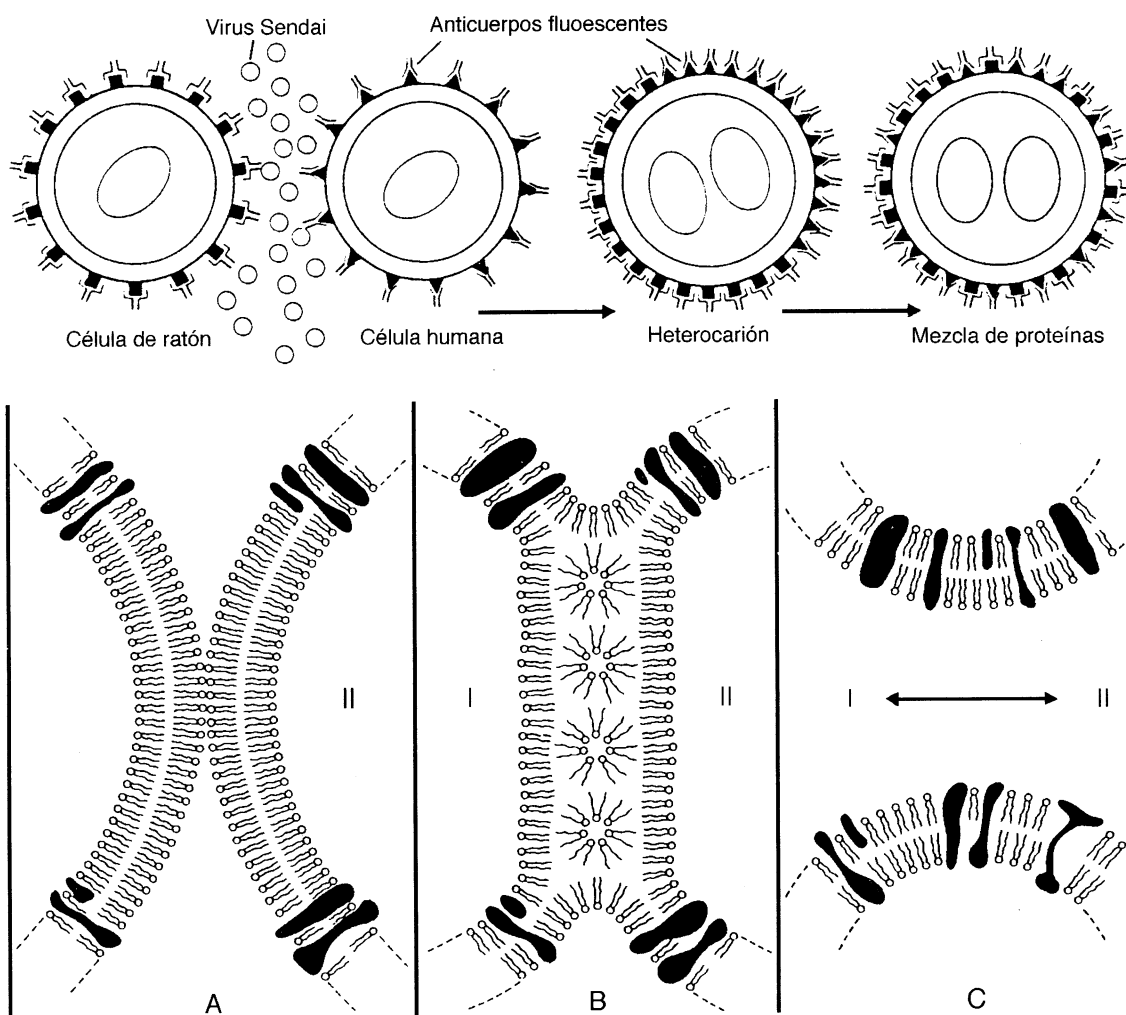


FIG. 4-11. Arriba. Esquema que representa el experimento de fusión celular de Frye y Edidin. Una célula de ratón y una humana, con diferentes proteínas de membrana marcadas con anticuerpos fluorescentes de diferentes colores, son fusionadas por influencia del virus Sendai. Se origina un heterocarión en el cual la mitad de la superficie posee proteína de ratón y la otra mitad proteína humana. Al cabo de 40 minutos se ha producido una mezcla de las proteínas debido a su movilización en el plano de la membrana. **Abajo.** Posible interpretación del mecanismo molecular que interviene en la fusión celular (véase la descripción en el texto). (Copiado de Schaier y P. Overath [1969] J. Mol. Biol. 44:209.)

óptica enfocada sobre una microesfera, se puede impulsar a la proteína marcada en el plano líquido de la membrana hasta que encuentre algún obstáculo.

Estas técnicas demuestran que una buena parte de las proteínas permanecen confinadas transitoriamente en pequeños dominios de las membranas, otras se mueven aparentemente al azar dentro de territorios algo más amplios, y por último unas pocas desarrollan largos trayectos dirigidos, con gran velocidad de desplazamiento, aparentemente propulsadas por proteínas relacionadas con el citoesqueleto del citoplasma adyacente.

Como veremos más adelante, tanto las uniones intercelulares oclusivas como las interacciones de las proteínas integrales con elementos del citoesqueleto contribuyen a delimitar los dominios de membrana y a condicionar los tipos de desplazamiento de las diversas proteínas.

ESQUELETO MEMBRANOSO

La primera definición del llamado *esqueleto de membrana* provino de la observación de que el detergente no iónico tritón X-100, luego de eliminar los componentes hidrofóbicos en la membrana del eritrocito humano, mantenía la unidad de una estructura con la forma y dimensiones de la membrana, en la cual estaban interconectadas estrechamente sus proteínas integrales y las citoesqueléticas. Recordemos que en este tipo celular el citoesqueleto no posee un desarrollo transcitoplasmático, sino que sus proteínas (como la actina o la espectrina) se ubican inmediatamente por debajo de la membrana, íntimamente asociadas a ésta. El concepto de esqueleto de membrana se aplicó a otros tipos celulares y se generalizó como el de un sistema físicamente interconectado entre las proteínas integrales y las del citoesqueleto, que controla la

forma celular, la estabilidad de la membrana, la organización de dominios membranosos y la adhesión celular.

Debido a su relativa simplicidad y a la facilidad con que se pueden obtener preparaciones purificadas, el esqueleto de membrana mejor estudiado es el del eritrocito humano. Como es sabido, los eritrocitos poseen una vida media de 120 días, y de mantenerse circulantes durante todo ese término deberían recorrer más de 100.000 veces el circuito vascular. Los eritrocitos experimentan continuamente una serie de deformaciones, en especial a lo largo de los capilares, muchos de los cuales son de menor diámetro que la propia célula. Por ello es que sus membranas deben poseer una estabilidad y una flexibilidad particulares.

Como se ilustra en la figura 4-12, por debajo de la membrana del eritrocito subyace una malla filamentosa formada por *espectrina*, cortos filamentos de *actina-tropomiosina* y otras proteínas asociadas. Toda esta red continua permanece anclada a proteínas integrales de la membrana por medio de la *anclina* y la *proteína de banda 4.1*.

La anclina media la unión de la espectrina —que forma oligómeros pares— con el dominio citoplasmático de la *proteína de banda 3*, glucoproteína transmembranosa de paso múltiple que, además de poseer este papel estructural en el esqueleto de la membrana, funciona como canal de intercambio aniónico de cloro-bicarbonato, fundamental en la citofisiología del eritrocito. La abundancia de las moléculas de banda 3 se puede evidenciar con la microscopía electrónica de transmisión por medio de la técnica de congelación-fractura y réplica (fig. 4-13).

La proteína 4.1 se une a la espectrina y a la actina, junto con otras proteínas asociadas, en los llamados "*complejos de unión*", que son los sitios de entrecruzamiento de la red filamentosa flexible submembranosa.

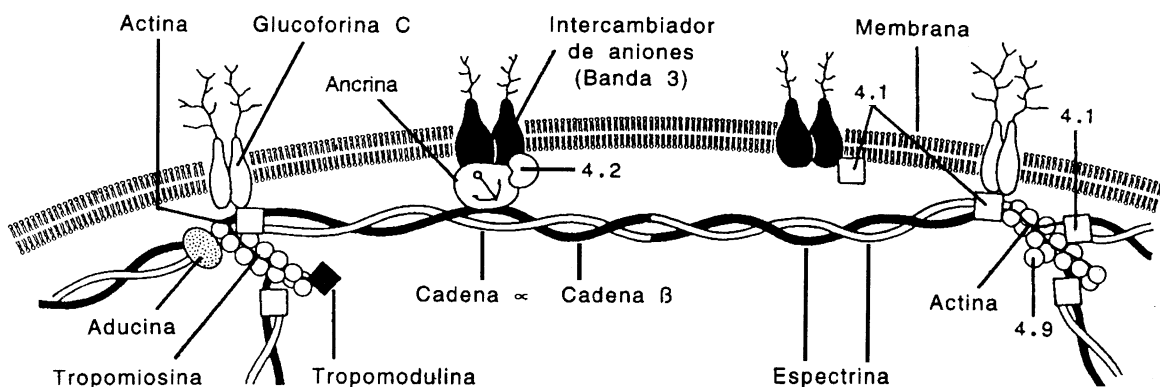


FIG. 4-12. Esquema que ilustra la membrana del eritrocito, con su capa bilipídica y las proteínas transmembranosas de banda 3, a las cuales se une el esqueleto de membrana por medio de las proteínas mencionadas en el texto.

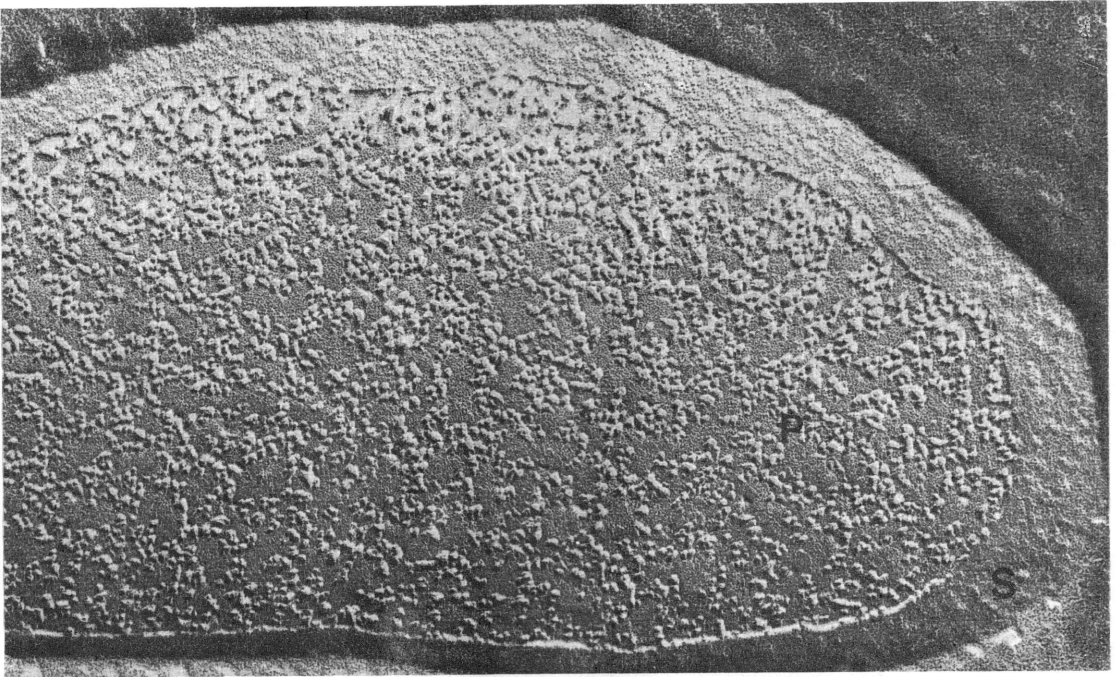


FIG. 4-13. Microfotografía electrónica de la membrana de un eritrocito, obtenida por la técnica de la congelación, fractura, grabado y réplica. La mayor parte de la superficie presenta partículas que están intercaladas en el plano fracturado de la membrana (P), que representa la mitad interna del interior hidrofóbico (dirigida hacia el exterior) de la membrana del eritrocito. El área lisa (S) corresponde a la superficie externa del eritrocito, expuesta al grabado. 88.000X. (Cortesía de D. Branton.)

A su vez, la proteína 4.1 contribuye a la unión de este retículo con la membrana, uniéndose tanto a la proteína de banda 3 como secundariamente a la *glucoforina*, que es el otro componente proteico transmembranoso principal del eritrocito.

Pese a su abundancia en esta membrana, la función de la glucoforina es desconocida. Su papel en el esqueleto de membrana es ciertamente secundario, ya que los eritrocitos que carecen de glucoforina por un defecto genético, si bien poseen una

forma elipsoidal, son por lo demás normales. Es de destacar que, por el contrario, los defectos en la espectrina, la ancrina, la banda 3 o la banda 4.1 se manifiestan en el hombre por alteraciones de la forma y anemias por incremento de la fragilidad de los eritrocitos.

Existen numerosas proteínas que no se unen directamente a la membrana del eritrocito, pero contribuyen a la estabilidad de su esqueleto. En la tabla 4-3 se caracterizan sus principales componentes.

TABLA 4-3. Principales polipéptidos y glucoproteínas de la membrana del eritrocito

Polipéptido	Peso molecular	Copias por fantasma	Denominación	
1	240.000	200.000	Espectrina α	Citoesqueleto
2	220.000	200.000	Espectrina β	
2.1	200.000	100.000	Ancrina	
3	93.000	1.200.000	Canal aniónico	Citoesqueleto
4.1	82.000	200.000		
4.2	76.000			
4.9	48.000	100.000		
5	43.000	500.000	Actina	Citoesqueleto
6	35.000	540.000	G3PD	
7	28.000	403.000		
Glucoproteínas				
PAS 1	55.000	500.000	Glucoforina	
PAS 2			Sialoglucoproteína	

Se identificaron proteínas estrechamente relacionadas con la espectrina, la banda 3, banda 4.1, banda 4.2, la ancrina, la aducina y otras, asociadas a las membranas de muchos tipos celulares *diferentes del eritrocito*. En especial, la ancrina y la isoforma no eritrocítica de la espectrina (*fodrina*) se concentran en ciertos dominios membranosos, especializados tanto en la estabilidad mecánica como en la restricción de los movimientos laterales de las proteínas en el plano de la bicapa, como por ejemplo en las densidades postsinápticas del cerebro o en los pliegues basolaterales de células epiteliales. En estos otros tipos celulares las proteínas del esqueleto membranoso están unidas a otras proteínas además de la de banda 3; por ejemplo, a los canales de sodio regulados por voltaje en el cerebro, o a la bomba de sodio-potasio del dominio basolateral de las células tubulares proximales del riñón.

Dentro de la familia de la espectrina se encuentra una proteína de gran tamaño (la mayor del grupo) denominada *distrofina*. Se halla asociada a las membranas de las células musculares, donde conecta lateralmente a los filamentos de actina con una glucoproteína transmembranosa, e induce el plegamiento ordenado y la estabilidad de la membrana durante la contracción. También se expresa en neuronas y astrocitos, donde estabiliza las membranas postsinápticas y las de los pies chupadores. Esta proteína es codificada por un gen del cromosoma X (en la región Xp21). La ausencia congénita de esta proteína del esqueleto membranoso (en la distrofia muscular de Duchenne) se manifiesta por roturas de la membrana, con inestabilidad osmótica e incremento del ingreso de calcio en las células musculares que lleva a la degeneración celular, alteraciones neurológicas, incapacidad y muerte del paciente a edad temprana.

PERMEABILIDAD DE MEMBRANA

La permeabilidad de las membranas es fundamental para el funcionamiento de la célula viva y para el mantenimiento de condiciones fisiológicas intracelulares adecuadas. Esta función determina

TABLA 4-4. Concentración iónica y potencial estable en el músculo (modificado de Woodbury)

	<i>Líquido intersticial</i>	<i>Líquido intracelular</i>
Cationes { Na ⁺	145	12
{ K ⁺	4	155
Aniones { Cl ⁻	120	3,8
{ CO ₃ H ⁻	27	8
{ A ⁻ y otros	7	155
Potencial	0	-90 mV

qué sustancias pueden ingresar a la célula, muchas de las cuales son necesarias para mantener los procesos vitales y la síntesis de sustancias. También regula el pasaje de agua y la salida de productos de desecho que deben ser eliminados de la célula.

La presencia de membrana establece una neta diferencia entre el líquido intracelular y el extracelular en que está inmersa la célula. En los organismos unicelulares que crecen en los ríos o en los mares, el líquido extracelular es el agua dulce o salada, respectivamente. En los organismos multicelulares el líquido interno, en especial el denominado líquido intersticial, es el que está en contacto con la superficie externa de la membrana celular.

Una de las funciones de la membrana celular consiste en mantener la constancia de su medio intracelular, incluido el equilibrio osmótico con el líquido intersticial. La tabla 4-4 permite comparar las concentraciones iónicas dentro y fuera de una célula típica de vertebrado.

La función reguladora del equilibrio hidroelectrolítico de la membrana plasmática normal se aprecia mejor considerando ciertos defectos de la permeabilidad que ocurren por depleción de ATP o por activación de fosfolipasas como consecuencia de una serie de situaciones patológicas. La membrana plasmática también puede dañarse directamente por el ataque de linfocitos citotóxicos (con inserción de perforinas), por activación del sistema del complemento, por toxinas bacterianas o por una multitud de agentes químicos o físicos. En todos estos casos la lesión celular inicial característica es la tumefacción o edema celular agudo, con aumento del volumen celular por ganancia de agua, dilatación de los componentes del sistema de endomembranas y de mitocondrias, junto con alteraciones más complejas que llevan con el tiempo a la muerte celular.

Existen dos tipos muy diferentes de pasaje de sustancias a través de las membranas celulares. En uno de ellos, que analizaremos inicialmente, los iones o las moléculas relativamente pequeñas son transportados por diferentes mecanismos a través de las membranas sin que éstas experimenten deformaciones evidentes. En el segundo caso, denominado transporte en masa, las macromoléculas o partículas aún mayores son incorporadas a la célula (o eliminadas de ella) por mecanismos que incluyen cambios visibles en las membranas, como es el caso de la fagocitosis, la pinocitosis y la exocitosis.

4-7. Permeabilidad de las membranas a moléculas pequeñas

La permeabilidad es pasiva si sólo obedece a las leyes de la física, como en el caso de la difusión simple. Es conocimiento común que si se coloca en

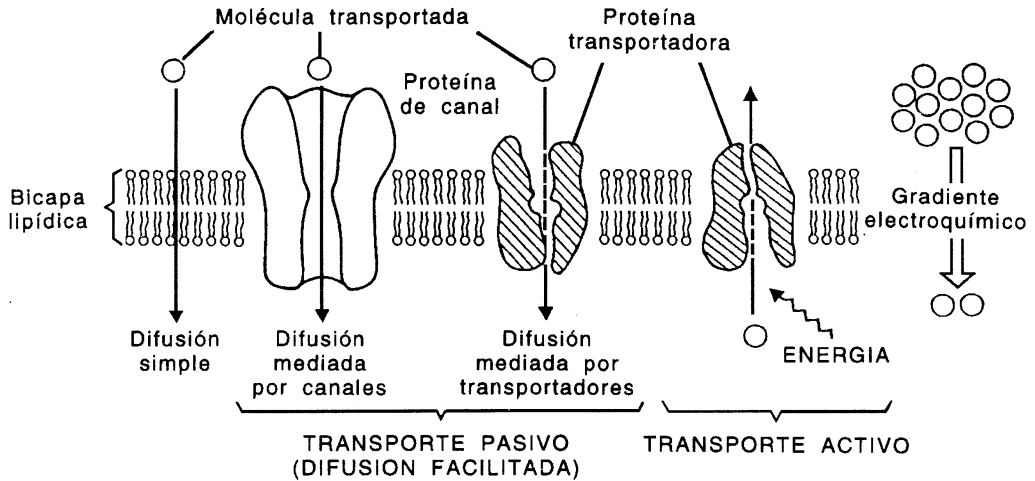


FIG. 4-14. Representación esquemática de los diferentes tipos de pasaje de sustancias a través de la membrana plasmática. En este ejemplo, la sustancia transportada se halla más concentrada en el lado extracelular (hacia arriba). No está representado el transporte activo secundario (por cotransporte).

un recipiente con agua una solución concentrada de una sustancia soluble (p. ej., azúcar), se producirá un movimiento de difusión del soluto siguiendo el gradiente de concentración. Sin embargo, si se interpone una membrana lipoproteica del tipo de las membranas biológicas, el movimiento de difusión se modifica considerablemente y la membrana actúa como una barrera para el paso de ciertas sustancias.

El pasaje de iones o moléculas pequeñas a través de las membranas biológicas puede ocurrir a favor o en contra de su gradiente de concentración químico o electroquímico.

En el caso de transporte a favor de gradiente, éste se puede realizar sin gasto de energía (*permeabilidad pasiva*). En ocasiones, esta permeabilidad pasiva ocurre por *difusión simple* a través de la capa bilipídica, mientras que para todos los iones y para una gran cantidad de moléculas son necesarias en la membrana *proteínas transportadoras especiales* (canales iónicos y permeasas). Se habla en este último caso de *difusión facilitada* (fig. 4-14).

Cuando el transporte debe hacerse en contra del gradiente de concentración, es necesario emplear energía. Esta energía puede provenir de la utilización directa de ATP por medio de las proteínas transportadoras, como es el caso del *transporte activo primario* (mediado por diversas categorías de bombas). Un ejemplo lo constituye la bomba de sodio-potasio.

En otros casos el transporte activo es *secundario* o *indirecto*, ya que una molécula o un ion son transportados en contra del gradiente sin consumo directo de ATP. En este caso la energía proviene del cotransporte de un ion o molécula diferente que atraviesa de manera simultánea la membrana a fa-

vor de concentración. La disipación de ese gradiente favorable es utilizada como energía por la proteína transportadora para motorizar el pasaje desfavorable en el mismo sentido (*simporte*) o en el opuesto (*antiporte*).

Permeabilidad de una capa bilipídica. Difusión simple

Al describir los modelos artificiales de membranas, estudiamos que es posible construir en el laboratorio una bicapa que cierre la comunicación entre dos compartimientos acuosos. En un sistema como éste se puede estudiar el pasaje de diversas sustancias en membranas lipídicas con ausencia de proteínas transportadoras. La figura 4-15 esquematiza el comportamiento de diferentes sustancias frente a una bicapa, en condiciones de gradiente favorable.

Las pequeñas moléculas no polares (vale decir, hidrofóbicas) difunden rápidamente a través de las membranas. En general penetran más rápidamente cuanto menor es la molécula y mayor su liposolubilidad. Pasan por difusión simple a través de la bicapa los gases, el benceno y ciertos medicamentos liposolubles, entre otros.

Las moléculas hidrofílicas también pueden difundir, con la condición de que no estén cargadas y de que posean pequeño tamaño. De esa manera pasan rápidamente el metanol, el etanol y el glicerol. También el agua puede atravesar la bicapa, aunque en la célula esto representa menos del 10% del total del pasaje acuoso a través de la membrana. Las moléculas hidrofílicas mayores, del tamaño de los monosacáridos en adelante, no atraviesan las bicapas en ausencia de proteínas. Es importante

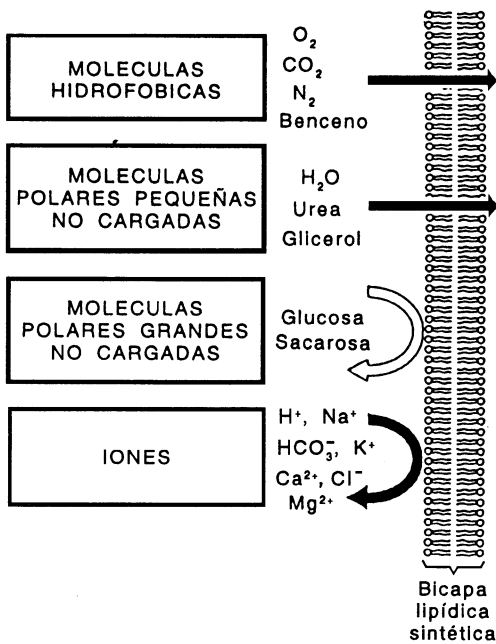


FIG. 4-15. Permeabilidad de una capa fosfolipídica artificial (y, por lo tanto, desprovista de proteínas transportadoras) a diferentes sustancias. Es importante notar que los iones no atraviesan la bicapa, cualquiera que sea su tamaño o carga.

destacar que todas las partículas cargadas, por pequeño que sea su tamaño (como el caso de un protón), son incapaces de atravesar la bicapa lipídica, dado que atraen moléculas de agua (que son dipolares) y se rodean constantemente de una capa acuosa, y esta capa de hidratación o nube acuosa es de considerables dimensiones.

Permeabilidad de las membranas celulares

Como en el caso de las membranas bilipídicas artificiales, las membranas biológicas permiten la difusión simple del mismo tipo de moléculas que aquéllas. Sin embargo, en las membranas celulares también ocurre el pasaje de iones, aminoácidos, monosacáridos y aun moléculas hidrofílicas mayores. Esto se debe a la presencia, en todas las membranas biológicas, de proteínas transportadoras especiales. En general son proteínas de paso múltiple, vale decir que la cadena polipeptídica recorre el espesor de la membrana varias veces, lo cual determina un interior acuoso en su estructura que aísla del interior hidrofóbico de la membrana a la sustancia transportada.

Cada una de las proteínas transportadoras es específica, en el sentido de que transporta solamente un tipo de molécula, y es capaz de discriminar incluso diferentes tipos de aminoácidos o de monosacáridos entre sí.

Transporte pasivo o difusión facilitada. Este tipo de transporte se hace siempre a favor del gradiente electroquímico, y las proteínas transportadoras pueden ser de dos clases: *canales iónicos* o *permeasas*.

Una diferencia fisiológica fundamental entre la difusión simple y el transporte pasivo lo constituye su *cinética*. En la difusión simple la velocidad de pasaje es siempre proporcional a la diferencia entre las concentraciones a ambos lados de la membrana, mientras que en el transporte pasivo (o difusión facilitada) la velocidad de transporte aumenta rápidamente con la diferencia de concentraciones, pero se llega a un tope ($V_{\text{máx}}$) cuando todas las proteínas transportadoras de la membrana están funcionando al máximo de su velocidad. Se dice entonces que el sistema está *saturado*. Esto vale tanto para las permeasas como para los canales iónicos.

Canales iónicos. El primer grupo de proteínas transportadoras que consideraremos está constituido por los llamados canales iónicos. Estos forman poros o *conductos hidrofílicos* que recorren el espesor de todas las membranas celulares y permiten el flujo pasivo de iones a través de éstas. Son altamente selectivos, por lo que en general facultan el paso de un solo tipo de ion. Los canales iónicos son teóricamente saturables, aunque no en condiciones fisiológicas. Existen canales que permanecen siempre abiertos, mientras que otros se abren y cierran regulados por señales químicas, eléctricas o mecánicas que provocan cambios conformacionales en las proteínas del canal (fig. 4-16).

Los *canales regulados*, de importancia fundamental en células musculares, secretorias, neuronas y otras, comprenden múltiples isoformas con diferentes tipos de regulación, selectividad iónica o velocidades de apertura o cierre, que se expresan de manera diferencial en distintos tipos celulares a lo largo del desarrollo.

1) **Canales regulados por voltaje.** Existen canales regulados para sodio, potasio y calcio. Los canales de sodio de las células musculares, por ejemplo, permanecen cerrados cuando la membrana plasmática mantiene su potencial de reposo, que es negativo para el interior celular con una diferencia de voltaje de unos -90 mV. Cuando se despolariza un punto de la membrana de estas células, el campo eléctrico modificado de la membrana influye sobre regiones cargadas de las proteínas del canal y provoca su apertura. El sodio, más concentrado en el exterior de la célula que en el interior, penetra por diferencia de gradiente electroquímico y contribuye aún más al cambio de potencial, pues hace que se abran canales de sodio más alejados y causa así la propagación de la despolarización a lo largo de la membrana.

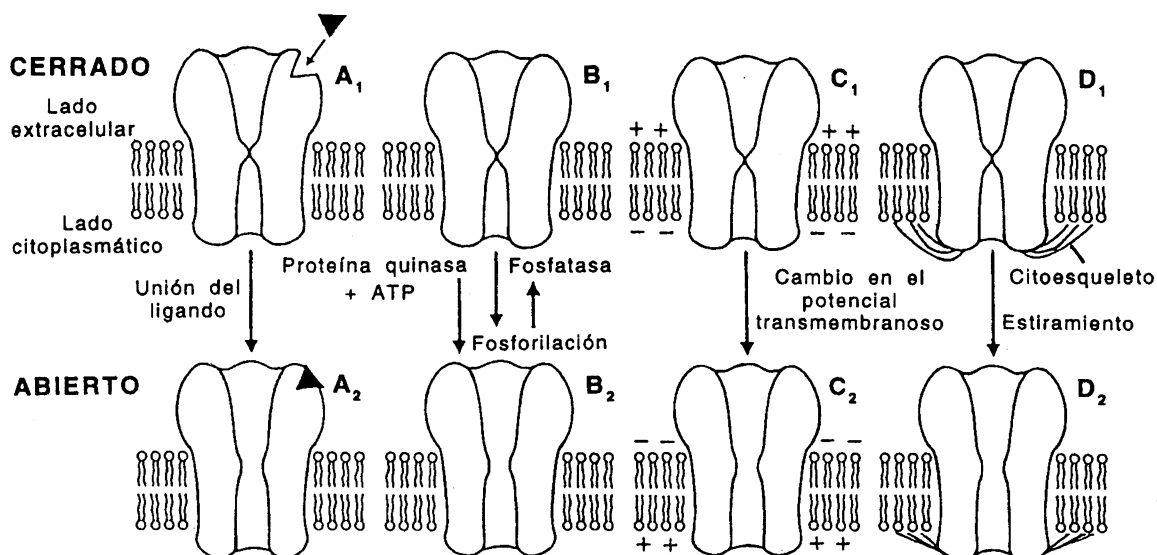


FIG. 4-16. Representación esquemática de los posibles mecanismos de apertura y cierre en diferentes tipos de canales iónicos regulados.

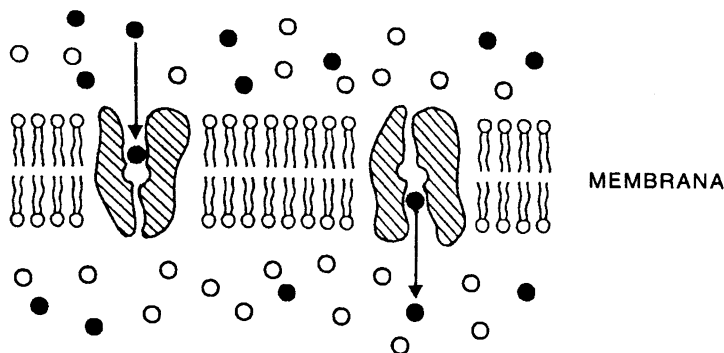
2) **Canales regulados por ligando.** Se trata de canales-receptores que, al unirse con su ligando específico, experimentan un cambio conformacional que determina su apertura. Un ejemplo lo constituye el receptor de acetilcolina, canal de sodio regulado que en la sinapsis se encarga de iniciar la despolarización de la membrana postsináptica. Los ligandos pueden unirse al lado extracelular del canal —como, por ejemplo, los neurotransmisores— o, en algunos casos, al dominio citosólico —como ocurre con el AMPc u otros mensajeros intracelulares—.

3) **Canales regulados mecánicamente.** Se abren regulados por el **estiramiento** de las membranas. Se piensa que la tensión es transmitida a las proteínas del canal por elementos del citoesqueleto. En el caso de las células neuroepiteliales del oído interno, las fuerzas que actúan sobre estos canales se transmiten a través de fibrillas insertadas en la cara extracelular.

Permeasas. El segundo tipo de proteínas para el transporte pasivo lo constituyen las permeasas o transportadores (a veces denominadas *carriers* según su nombre en inglés). También son *muy específicas*, ya que discriminan incluso entre isómeros, como es el caso de la glucosa y la galactosa, que si bien difieren solamente en la posición de un oxhidrilo en el carbono 4, requieren dos permeasas diferentes. En todos los casos la molécula transportada debe unirse a un sitio específico de la permeasa, la que sufre una serie de cambios conformacionales para finalmente trasladar al soluto a la cara opuesta de la membrana, sin gasto de energía. Estos procesos *limitan la velocidad del transporte*, que es *más lento* que para el caso de los canales iónicos. En la figura 4-17 se representa el mecanismo propuesto para el transporte selectivo por medio de permeasas.

Otro de los mecanismos postulados para la difusión facilitada, el del translocador móvil, es muy

FIG. 4-17. Esquema hipotético del mecanismo de cambio conformacional de una proteína transportadora (o *carrier*) que permite que una molécula sea translocada de un lado a otro de la membrana, a favor de gradiente, por difusión facilitada.



improbable desde el punto de vista termodinámico. El único caso de transportadores móviles conocidos es el de ciertos ionóforos de uso experimental, como la valinomicina o el A23187. Otros ionóforos utilizados, como el antibiótico gramicidina, forman canales convencionales.

Transporte activo. En algunos casos las proteínas transportadoras deben mediar el pasaje de iones o de moléculas *en contra del gradiente electroquímico*. En esta circunstancia se requiere el uso de energía y se habla de transporte activo.

Existen dos tipos de transporte activo: el *primario* (mediado por ATPasas) y el *secundario* (mediado por proteínas cotransportadoras). En ambos casos, directa o indirectamente debe consumirse energía, y ésta proviene sobre todo de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. Como consecuencia de ello, el transporte activo está acoplado a la respiración celular.

Transporte activo primario. Las permeasas especiales que utilizan ATP directamente como fuente de energía para el transporte activo se denominan *bombas* o *ATPasas*. Las bombas (o ATPasas de membrana) comprenden varias familias de proteínas. Algunas están formadas por múltiples cadenas polipeptídicas asociadas, y todas tienen en común la característica de que transportan (y a veces cotransportan) un determinado tipo de ion en contra del gradiente electroquímico con utilización de ATP. En algunos casos, como el de la P-170, la molécula transportada no es un ion. Analizaremos varios ejemplos de bombas o ATPasas de membrana.

1) *Bombas de protones.* Existen varias clases, algunas de ellas asociadas a las membranas plasmáticas y otras a orgánulos membranosos, como lisosomas, endosomas, gránulos secretorios y vacuolas de células vegetales y de eucariotas inferiores. En el interior de los endolisosomas determinan una concentración de iones hidrógeno que lleva el pH a valores inferiores a 5.

Las ATPasas de clase F de los procariotas, cloroplastos y mitocondrias también son bombas protonicas, pero en el caso de las mitocondrias suelen funcionar en reversa sintetizando ATP.

2) *Bombas de calcio.* Existen en las membranas plasmáticas y en las membranas internas como las del retículo sarcoplasmático. En ambos casos el calcio es removido del citosol hacia el exterior de la célula o hacia el interior del compartimiento citoplasmático secuestrador de calcio. Ambos mecanismos, junto con un sistema de antiporte sodio-calcio que analizaremos más adelante, son responsables de que el calcio se mantenga unas 4.000 veces menos concentrado en el citosol que en el medio extracelular.

3) *Glucoproteína P (P-170).* Comprende una variedad de isoformas de proteínas transmembranas que se expresan en las membranas plasmáticas de los hepatocitos, enterocitos y células del epitelio renal. Intervienen en la excreción hacia la bilis, el intestino y la orina de una serie de toxinas hidrofóbicas del metabolismo normal, a las que transportan contra gradiente al exterior de las células con consumo de ATP. A este tipo de molécula también se lo denomina *ATPasa de resistencia a multi-drogas*, dado que ciertas células tumorales sobreexpresan esta proteína, que extrae rápidamente del citoplasma a las drogas citostáticas y torna inefectiva la quimioterapia antitumoral.

4) *Bomba de sodio-potasio.* Es de fundamental importancia para el metabolismo celular. Está constituida por un tetrámero de dos subunidades transmembranas α y dos β . En el dominio citosólico de la subunidad β reside el sitio catalítico para la hidrólisis del ATP y el sitio para la unión de tres iones sodio. En el dominio extracelular existe el sitio de unión de dos iones potasio; este sitio puede ser ocupado por la ouabaína, que es un glucósido digitálico que inhibe el funcionamiento de la bomba (fig. 4-18).

La concentración de sodio es característicamente unas 15 veces mayor en el líquido extracelular que dentro de la célula, mientras que la situación inversa se da para el potasio, que es preferentemente intracelular. Estas concentraciones son mantenidas por la actividad de la bomba de sodio-potasio, que cotransporta ambos iones en contra de sus gradientes. Dado que se debe hidrolizar una molécula de

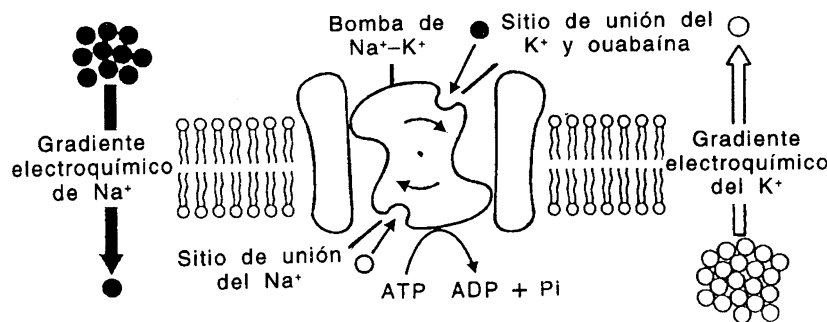


FIG. 4-18. Esquema de la bomba de sodio-potasio. Están representadas la glucoproteína lateral y la gran subunidad catalítica, con sus sitios de unión al sodio y al potasio. Los digitálicos compiten con el potasio en este sitio, e inhiben la acción de la ATPasa.

ATP por cada tres sodios que se extraen y cada dos potasios que se introducen, para mantener las concentraciones iónicas normales el consumo de energía es muy alto, y varía según los tipos celulares desde un 10% hasta un 65% del consumo energético total.

Como consecuencia de la actividad de la bomba de sodio-potasio, la célula puede mantener su balance osmótico y estabilizar así su volumen. En algunos casos de anoxia o de lesión celular, la producción de ATP está disminuida y la energía disponible no es suficiente para el funcionamiento normal de la bomba de sodio-potasio. Como ya vimos, en estas circunstancias la lesión celular inicial característica es la tumefacción o edema celular agudo, con aumento del volumen celular por ganancia de agua, junto con alteraciones más complejas que culminan en la muerte celular.

Se dice que la bomba de sodio-potasio es *electrogénica*, vale decir que tiende a crear un potencial eléctrico de membrana, con el interior negativo, dado que por cada tres cationes que extrae de la célula introduce solamente dos. Las propiedades eléctricas de la membrana se considerarán en detalle en el capítulo 7-29.

Transporte activo secundario. Utiliza la *energía potencial* contenida en el *gradiente favorable de la sustancia cotransportada*. El elemento más importante que motoriza el cotransporte a través de la membrana plasmática es el sodio, cuyo gradiente favorable, a su vez, debe mantenerse con gran gasto de energía. En algunas ocasiones la sustancia cotransportada es introducida contra gradiente junto con el sodio (*simporte*), como en uno de los tipos de transportadores de glucosa de los enterocitos o del epitelio renal. En otras células la entrada de sodio se utiliza para extraer al otro elemento (*antiporte*), como el intercambiador de sodio-calcio de los cardiocitos. A propósito de este último ejemplo, recordemos que los glucósidos digitálicos, como la ouabaína, inhiben la bomba de sodio-potasio. Este es justamente el mecanismo de acción de los digitálicos en la terapia de la insuficiencia cardíaca congestiva: alterar el gradiente de sodio, de modo de interferir en su cotransporte con el calcio; el consiguiente aumento de la concentración de éste en los cardiocitos incrementa su contractilidad.

4-8. Permeabilidad de las membranas a macromoléculas y partículas

Las macromoléculas y las partículas de nivel supramolecular, algunas de ellas de gran tamaño, pueden ser introducidas en la célula (o extraídas de ella) por un mecanismo completamente diferente de los que acabamos de analizar. En sentido estricto, estas partículas nunca atraviesan las membranas,

sino que por un proceso de deformación y fusión de membranas se produce el llamado transporte en masa, que incluye las diversas formas de *endocitosis* (*pinocitosis* y *fagocitosis*) si el material se incorpora a la célula; si el material es eliminado al exterior se habla de *exocitosis*.

En el capítulo 8 analizaremos estos procesos en el contexto del sistema de endomembranas y del tránsito citoplasmático de membranas.

BIBLIOGRAFIA

- Altenberg G. A., Vanoye C. G., Hari E. S., Deitmer W. J. and Reuss L. (1994) Relationships between rhodamine transport, cell volume and ion-channel function of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 269:7145.
- Askenasy N., Vivi A., Tassini M. and Navon G. (1995) Cardiac energetics, cell volumes, sodium fluxes and membrane permeability: NMR studies of cold ischemia. *Amer. J. Physiol.; Heart Circ. Phys.* 38:H1056.
- Bernfield M. et al. (1992) Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:365.
- Bertessy B. G. and Steck T. L. (1989) Elasticity of the human red cell membrane skeleton: effects of temperature and denaturants. *Biophys. J.* 55:255.
- Brown D., Katsura T., Kawashima M., Verkman A. S. and Sabolic I. (1995) Cellular distribution of the aquaporins: A family of water channel proteins. *Histochem. Cell Biol.* 104:1.
- Caffrey M. and Cheng A. (1995) Kinetics of lipid phase changes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:548.
- Cader A. A. et al. (1995) Electron spin resonance studies of fatty acid-induced alterations in membrane fluidity in cultured endothelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27:665.
- Carafoli E. (1992) The Ca^{2+} pump of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 267:2115.
- Chernomordik L. V. and Zimmerberg J. (1995) Bending membranes to the task: Structural intermediates in bilayer fusion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:541.
- Deen P. T. et al. (1994) Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 264:92.
- Devaux P. F. (1992) Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21: 417.
- Devaux P. (1993) Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid bilayers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:489.
- Drickamer K. and Carver J. (1992) Carbohydrates and glycoconjugates: upwardly mobile sugars gain status as information-bearing molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 653.
- Endicott J. A. and Ling V. (1989) The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Ann. Rev. Biochem.* 58:137.
- Eveloff J. L. and Warnock D. G. (1987) Activation of ion transport systems during cell-volume regulation. *Am. J. Physiol.* 252:1.
- Fabbriozzi E., Bonet Kerrache A., Limas F., Hugo G. and Monet D. (1995) Dystrophin, the protein that promotes membrane resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 295.
- Feizi T. (1993) Oligosaccharides that mediate mammalian cell-cell adhesion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:701.
- Fliegel L. and Fröhlich O. (1993) The Na^+/H^+ exchanger: an update on structure, regulation and cardiac physiology. *Biochem. J.* 296:273.
- Forgac M. (1989) Structure and function of the vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol. Rev.* 69:765.

- Frye L. D. and Edidin M. (1970) The rapid intermixing of cell-surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J. Cell Sci.* 7:319.
- Galen Wo Z. and Oswald R. E. (1995) Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *TINS* 18:161.
- Gardner K. and Bennett V. (1987) Modulation of spectrin-actin assembly by erythrocyte adducin. *Nature* 328:359.
- Gould G. W. and Bell G. I. (1990) Facilitative glucose transporters: an expanding family. *Trends Biochem. Sci.* 15:18.
- Hakomori S. (1986) Glycosphingolipids. *Sci. Am.* 254:44.
- Handler J. S. (1989) Overview of epithelial polarity. *Ann. Rev. Physiol.* 51:729.
- Hearse D. J. (1995) Activation of ATP-sensitive potassium channels: A novel pharmacological approach to myocardial protection? *Cardiovasc. Res.* 30:1.
- Higgins C. F. (1995) The ABC of channel regulation. *Cell* 82:693.
- Hudspeth A. J. (1983) The hair cells of the inner ear. *Sci. Am.* 248:54.
- Hughes C. A. and Bennett V. (1995) Adducin: A physical model with implications for function in assembly of spectrin-actin complexes. *J. Biol. Chem.* 270:18990.
- Ismailov I. I. and Benos D. J. (1995) Effects of phosphorylation on ion channel function. *Kidney Int.* 48:1167.
- Jacobson K., Sheets E. and Simson R. (1995) Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268:1441.
- Jennings M. L. (1989) Topography of membrane proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58:999.
- Jentsch T. J. (1993) Chloride channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3:316.
- Kellerman P. S., Clark R. A. F., Hoilien C. A., Linas S. L. and Molitoris B. A. (1990) Role of microfilaments in maintenance of proximal tubule structural and functional integrity. *Am. J. Physiol.* 259:279.
- Kopito K. K. (1990) Molecular biology of the anion exchanger gene family. *Int. Rev. Cytol.* 123:177.
- Lipowsky R. (1995) The morphology of lipid membranes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:531.
- Lloret S. and Moreno J. J. (1995) Ca^{2+} influx, phosphoinositide hydrolysis, and histamine release induced by lysophosphatidylserine in mast cells. *J. Cell Biol.* 165:89.
- Low M. G. (1989) Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB J.* 3:1600.
- Luna E. and Hitt A. (1992) Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 258:955.
- Moore A. S., Leveille C. R., Reimann K. A., Shiu H. and Arias I. M. (1995) The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. *Cancer Invest.* 13:475.
- Mueckler M. (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229:941.
- Ostro M. (1987) Liposomas. *Investigación y Ciencia* 126:75.
- Pedersen P. L. and Carafoli E. (1987) Ion motive ATPases: ubiquity, properties and significance to cell function. *TIBS* 12:146.
- Porschke D. and Grell E. (1995) Electric parameters of Na^{+} - K^{+} -ATPase by measurements of the fluorescence-detected electric dichroism. *Biochem. Biophys. Acta* 1231:181.
- Pumplin D. W. (1995) The membrane skeleton of acetylcholine receptor domains in rat myotubes contains anti-parallel homodimers of β -spectrin filaments quantitatively resembling those of erythrocytes. *J. Cell Sci.* 108:3145.
- Raff M. C. and De Petris S. (1973) Movement of lymphocyte surface antigens and receptors: the fluid nature of the lymphocyte plasma membrane and its immunological significance. *Fed. Proc.* 32:448.
- Rana A. P. S. and Majumder G. C. (1995) Lipid phase transition in the plasma membrane of the goat epididymal maturing spermatozoa. *J. Biosciences* 20:525.
- Rand R. P. and Parsegian A. (1986) Mimicry and mechanism in phospholipid models of membrane fusion. *Ann. Rev. Physiol.* 48:201.
- Rees D. C., De Antonio L. and Eisenberg D. (1989) Hydrophobic organization of membrane proteins. *Science* 245:510.
- Roepe P. D. (1994) Indirect mechanism of drug transport by P-glycoprotein. *TIPS* 15:445.
- Shah J., Atienza J. M., Rawlings A. V. and Shipley G. G. (1995) Physical properties of ceramides. *J. Lipid. Res.* 36:1945.
- Sharon N. and Lis H. (1993) Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* 263:82.
- Singer S. J. and Nicholson G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720.
- Singer S. J. (1990) The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6:247.
- Slot J. W. (1991) Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J. Cell Biol.* 113:123.
- Stühmer W. (1991) Structure-function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20:65.
- Südhof T. C., De Camilli P., Niemann H. and Jahn R. (1993) Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. *Cell* 75:1.
- Taniguchi K., Suzuki K., Kai D., Matsuoka I., Tomita K. and Iida S. (1984) Conformational change of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 259:15228.
- Urbina J. A. et al. (1995) Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol. *Biochem. Biophys. Acta* 1238:163.
- Uwin N. and Henderson R. (1984) The structure of proteins in biological membranes. *Sci. Am.* 250:78.
- Walmsley A. R. (1988) The dynamics of glucose transporter. *TIBS* 13:226.
- Wattiaux R. et al. (1995) Effects of cationic lipids on the uptake of exogenous DNA by rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213:81.
- Watts A., Uhlrich A. S. and Middleton D. A. (1995) Membrane protein structure: the contribution and potential of novel solid state NMR approaches. *Mol. Membr. Biol.* 12:233.
- Weir M. and Edidin M. (1988) Constraint of the translational diffusion of a membrane glycoprotein by its external domains. *Science* 242:412.
- Yeagle P. L. (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 822:267.

5 / Matriz citoplasmática y citoesqueleto

Roberto Ponzio

MATRIZ CITOPLASMÁTICA (CITOSOL), SISTEMA VACUOLAR, INCLUSIONES Y CITOESQUELETO

En el capítulo 1 mencionamos que a pesar de las diferencias estructurales entre las células procarióticas y eucarióticas, existían también notables semejanzas entre ellas (tabla 1-3). La *matriz citoplasmática* o *citoplasma fundamental* de una célula eucariótica contiene el mismo tipo de componentes que una bacteria, es decir, moléculas de ARN, proteínas globulares, enzimas, etcétera.

Las células superiores poseen, empero, nuevos componentes que surgieron por el proceso evolutivo, representados principalmente por los elementos citoesqueléticos y por las membranas intracelulares. Estas últimas comprenden el *sistema vacuolar* o *endomembranoso* y los organoides formados por membranas pero que no se consideran parte de aquél, como *mitocondrias*, *cloroplastos* o *peroxisomas*. En consecuencia, en la célula eucariótica aparecen diversos compartimientos y subcompartimientos.

En términos de dicha compartimentalización se pueden reconocer en el citoplasma dos territorios principales: por un lado el interior del sistema de organoides y estructuras membranosas, y por el otro el exterior de éste, representado por la matriz citoplasmática o citosol, verdadero medio interno de la célula que rellena todos los espacios. El citosol es especialmente notable en las células poco diferenciadas (fig. 5-1), ya que éstas poseen un desarrollo relativamente escaso de endomembranas.

Las propiedades coloidales de la célula, como las transformaciones básicas de sol a gel o las modificaciones de la viscosidad, dependen fundamentalmente de la matriz citoplasmática amorfa.

En el citosol se produce la mayor parte de las funciones citoplasmáticas. En él se encuentran numerosas macromoléculas, enzimas, ribosomas, la

trama del *citoesqueleto* y un número variable de cuerpos de inclusión o *inclusiones citoplasmáticas*, que son estructuras inconstantes (depósitos de glucógeno, gotitas lipídicas o cristales) no rodeadas por membranas.

Al realizar el procedimiento de fraccionamiento celular descrito en el capítulo 3-9, una vez separadas las fracciones nuclear, mitocondrial y microsómica, se obtiene la *fracción sobrenadante, soluble* o *citosol* (fig. 3-22), que es la que contiene las proteínas y las enzimas solubles del citoplasma. En sentido estricto, entonces, citosol es el término bioquímico o de fraccionamiento celular que designa al componente citoplasmático amorfo denominado *matriz citoplasmática* por los microscopistas.

La matriz citoplasmática contiene agua, iones, metabolitos de bajo peso molecular y macromoléculas. Entre estas últimas se encuentran gran cantidad de proteínas; por lo general del 20 al 25% de las proteínas totales de la célula pertenece a la matriz citoplasmática, aunque en algunos tipos celulares llegan hasta el 50%. Entre ellas se encuentran las enzimas de múltiples reacciones metabólicas, como las de la glucólisis anaerobia, las de la síntesis y degradación del glucógeno, las de múltiples reacciones que requieren ATP, y además toda la maquinaria para la síntesis de proteínas, que incluye la totalidad del ARN mensajero, los ARN solubles y los factores y enzimas relacionados con este proceso.

5-1. Las inclusiones citoplasmáticas son estructuras inconstantes inmersas en el citosol

Suspendidos en el seno de la matriz semifluida que compone el citosol existe un número de componentes citoplasmáticos denominados *inclusiones*, que representan acúmulos de nutrientes o subproductos relativamente inertes del metabolismo

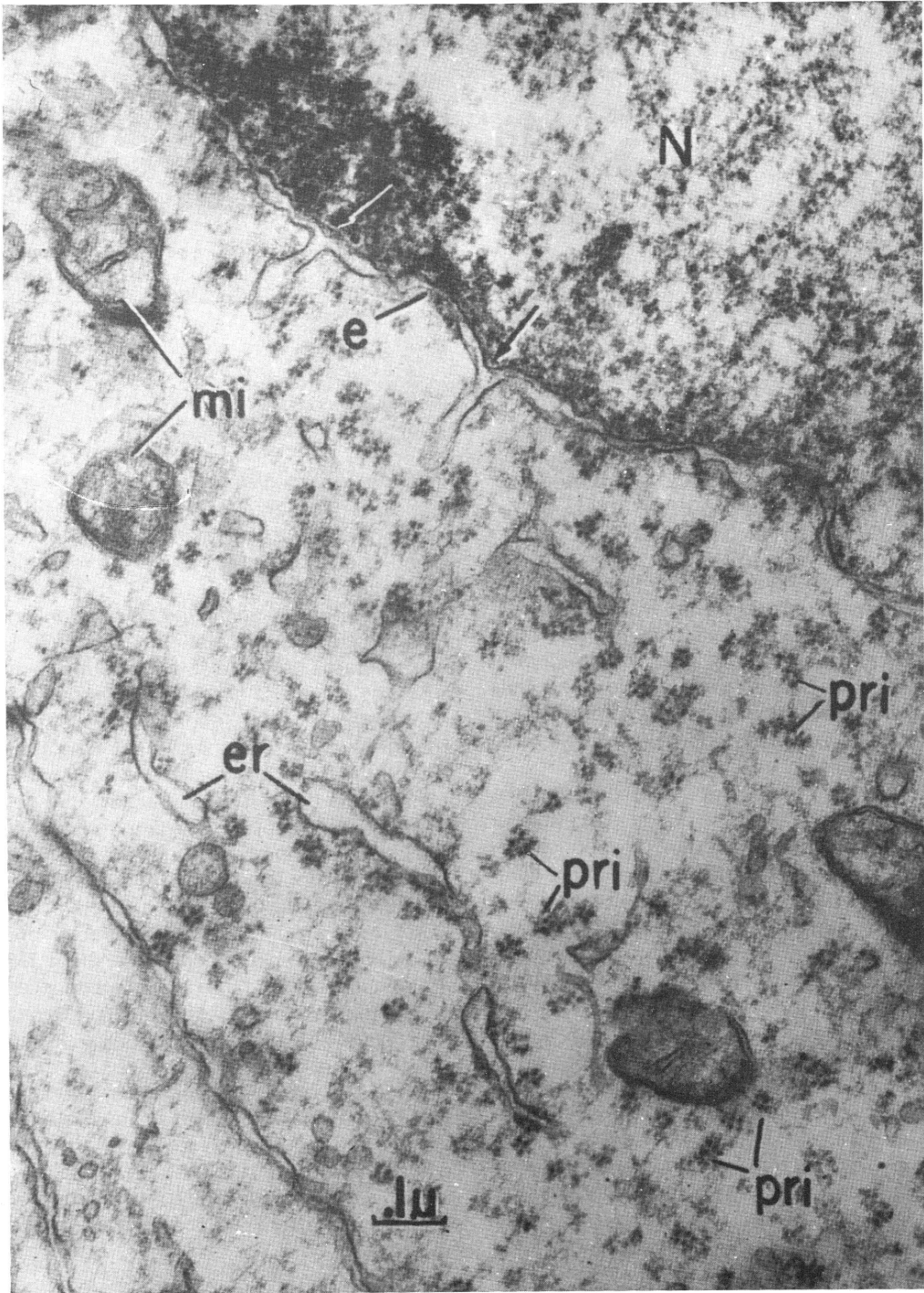


FIG. 5-1. Micrografía electrónica de un neuroblasto, que pone de manifiesto el citoplasma rico en matriz, con numerosos ribosomas y poco desarrollo del sistema vacuolar. N, núcleo; e, membrana nuclear enviando proyecciones al citoplasma (flechas); er, retículo endoplasmático; mi, mitocondrias; pri, polirribosomas o grupos de ribosomas. 45.000X. (De E. De Robertis.)

celular. Salvo contadas excepciones, no se encuentran rodeados por membranas. Su presencia no es esencial para el metabolismo celular, y su existencia

(transitoria o permanente) así como su abundancia varían grandemente según el tipo de célula o el grado de actividad de ésta.

5-2. El glucógeno es la forma intracelular de almacenamiento de glucosa en las células animales

La provisión energética de las células depende preferentemente de la captación de glucosa para su degradación metabólica en la vía de la glucólisis anaerobia. Cuando la disponibilidad de glucosa es elevada, la glucógeno sintetasa citosólica elabora grandes polímeros ramificados que constituyen las moléculas de glucógeno, que es la forma de depósito intracelular de glucosa transitoriamente inmovilizada.

Estas macromoléculas constituyen partículas electrodensas visibles con la microscopia electrónica, las cuales se agrupan en varios niveles de organización. Los *glucosomas* o partículas β son estructuras esféricas de unos 30 nm, formadas por un centro de polisacárido rodeado por una envoltura de proteínas enzimáticas relacionadas con su formación y destrucción. Los glucosomas permanecen separados o forman acúmulos granulares mayores (partículas α o rosetas) que carecen de envoltura membranosa (fig. 8-18).

Ciertos tipos celulares, en particular los hepatocitos, los miocitos, los leucocitos neutrófilos o ciertos epitelios, almacenan glucógeno en grandes cantidades en algunas fases de su actividad vital. Cuando el almacenamiento de glucógeno es alto, se lo puede visualizar con la microscopia óptica recurriendo a la técnica del PAS (cap. 3-6). Curiosamente, los hepatocitos perilobulillares de los niños y los adolescentes normales también acumulan glucógeno dentro del núcleo celular, lo mismo que ocurre en ciertas patologías como la diabetes o las glucososis.

Cuando existe necesidad de glucosa, las enzimas de la *glucogenólisis* localizadas en la superficie de los glucosomas (glucógeno fosforilasas) destruyen al polímero con liberación hacia el citosol de glucosa 1-fosfato, la que posteriormente es mutada en glucosa 6-fosfato y puede iniciar la vía catabólica de la glucólisis.

Los hepatocitos constituyen un tipo celular único, en el sentido de que no acumulan glucógeno para su propio uso sino principalmente para enviar glucosa hacia la sangre, a fin de mantener en ella una concentración relativamente constante del monosacárido (glucemia) aun después de varias horas de ayuno. Dado que las moléculas de la membrana plasmática transportadoras de glucosa (permeasas) son incapaces de movilizar glucosa fosfato, los hepatocitos poseen un sistema desfosforilante constituido por la glucosa 6-fosfatasa de su retículo endoplasmático liso (cap. 8) que genera glucosa libre, rápidamente transportada hacia el exterior de la célula.

5-3. Las inclusiones lipídicas tienen un significado funcional diverso

Los acúmulos lipídicos más comunes son las gotitas de triglicéridos. Estas formaciones esféricas, que carecen de membrana, poseen tamaños muy variables. Algunas son visibles solamente con el microscopio electrónico, mientras que otras alcanzan decenas de micrómetros, como la gota citoplasmática de los adipocitos, que son células especializadas en la acumulación de lípidos como reserva concentrada de nutrientes para todo el organismo. Otros tipos de células, como las musculares, pueden almacenar pequeñas gotitas lipídicas como reserva energética para su propia utilización en ciertas condiciones fisiológicas. En el hígado, que es el principal órgano involucrado en el metabolismo lipídico, es común la presencia de estas inclusiones de tamaño submicroscópico en el citoplasma de los hepatocitos. Ciertas glándulas, como las sebáceas, acumulan triglicéridos como material de secreción.

Pese a que las células utilizan ampliamente el colesterol para la síntesis de sus membranas, no existen depósitos visibles de este esteroide. Una excepción son las glándulas endocrinas que secretan hormonas esteroides, donde las gotitas lipídicas formadas por ésteres de colesterol representan un depósito de precursores hormonales que se movilizan y desaparecen rápidamente cuando las células son estimuladas para sintetizar sus hormonas.

En algunas células (como los hepatocitos, los cardiocitos o las células tubulares renales), si las inclusiones lipídicas alcanzan tamaño suficiente para ser visualizadas con el microscopio de luz, son indicadoras de lesión celular (por anoxia, toxinas, etc.).

5-4. Las inclusiones cristalinas son muy variadas y poseen un significado no siempre conocido

Los cristales son estructuras descriptas desde hace más de un siglo por los microscopistas ópticos como constituyentes normales de algunos tipos celulares, como las células de Sertoli y de Leydig del testículo humano. Pese a que en estos dos ejemplos los cristales están suspendidos en el citosol, se describieron estructuras cristalinas también en otros compartimientos celulares, como el núcleo, las cisternas del retículo granular, los peroxisomas o las mitocondrias.

Aunque la mayor parte de las inclusiones cristalinas están formadas por proteínas de naturaleza y función desconocidas, en algunos casos la composición no es proteica, como los cristales intranucleares de los hepatocitos del perro, que están constituidos por urato, lo mismo que los de las células de la córnea de los seres humanos afectados de

gota, que es un trastorno del metabolismo del ácido úrico.

En otros casos la proteína de los cristales es bien conocida, como el complejo de apoferritina y hierro (*ferritina*), que es la forma intracitosólica de depósito del hierro, la cual, cuando se acumula en grandes cantidades, puede cristalizar de manera característica.

En raras ocasiones, la presencia de cristales refleja una adaptación funcional importante, como en el caso de las células del *tapetum lucidum* del ojo de animales de hábitos nocturnos. En la luz crepuscular, los fotones que inciden en la retina de estos animales estimulan a sus fotorreceptores y luego se reflejan en la superficie del *tapetum*, que a modo de espejo detrás de la retina devuelve la luz hacia los fotorreceptores, estimulándolos nuevamente y reforzando así la sensibilidad de la visión. Los ojos de estos animales (gatos, zorros y otros) pueden brillar, por ejemplo, en la oscuridad de una carretera al reflejar la luz de los faros de un automóvil. El sustrato morfológico de la superficie espejada del *tapetum* son los citoplasmas de sus células aplanadas, repletos de cristales proteicos cilíndricos, regularmente espaciados.

5-5. Pigmentos

Muchas células poseen granulaciones citoplasmáticas de color pardo, descriptas por los citólogos clásicos como inclusiones de *lipofuscina* o *lipocromo*. Son infrecuentes en las células de vida breve y en los organismos jóvenes, pero su cantidad aumenta paulatinamente con la edad, especialmente en neuronas y cardiocitos, razón por la cual durante mucho tiempo se las denominó "pigmento de desgaste". Este pigmento es PAS positivo y se tiñe débilmente con los colorantes para lípidos. Hoy sabemos que representa estadios finales de la desintegración en vacuolas autofágicas que con el correr de los años fueron acumulando residuos indigeribles, metabólicamente inertes, que no pudie-

ron ser desdoblados por las enzimas lisosómicas (cap. 8).

La *melanina* es el pigmento castaño oscuro de la piel, el ojo y las leptomeninges de los mamíferos. Es una sustancia compleja sintetizada por células especializadas (los melanocitos) a partir del aminoácido tirosina, en estructuras vacuolares derivadas del aparato de Golgi denominadas melanosomas.

5-6. El citoesqueleto está constituido por microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios

Hace muchos años se describieron unas estructuras filamentosas en la matriz citoplasmática, y se acuñó para ellas el término *citoesqueleto*, que no fue aceptado por la mayor parte de los citólogos clásicos dado que muchas de las estructuras citoplasmáticas se consideraron como artificios de fijación.

En 1928 Koltzoff consideró la existencia de una organización fibrosa en el citoplasma. Afirmó que "cada célula es un sistema de componentes líquidos y de esqueletos rígidos que generan la forma de la célula, y aunque rara vez se observan fibras esqueléticas en las células vivientes o fijadas, eso sólo significa que estas fibrillas son muy finas y no se distinguen por su índice de refracción de la solución coloidal que las rodea". Por lo tanto, concibió un citoesqueleto que determina la forma celular y sus cambios.

Confirmando esta suposición, el microscopio electrónico ha revelado que la casi totalidad de las células eucarióticas tiene una trama citoesquelética formada por microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (fig. 5-2).

MICROTUBULOS

Los microtúbulos son estructuras universalmente presentes en el citoplasma de los eucariotas. Aunque tal como se los conoce en la actualidad fueron

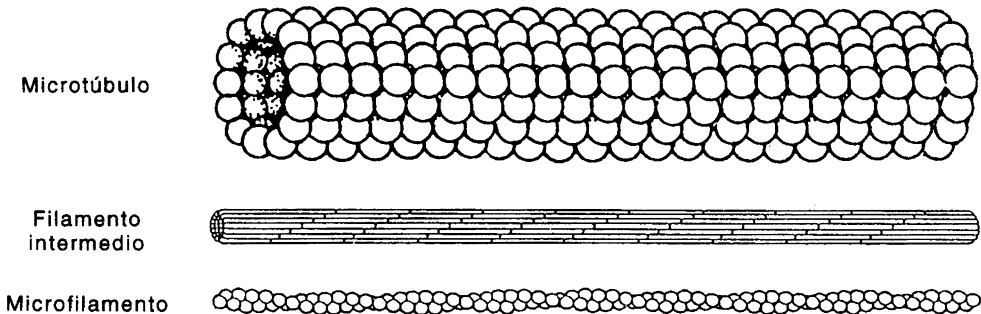


FIG. 5-2. Estructura y dimensiones relativas de los tres componentes principales del citoesqueleto.

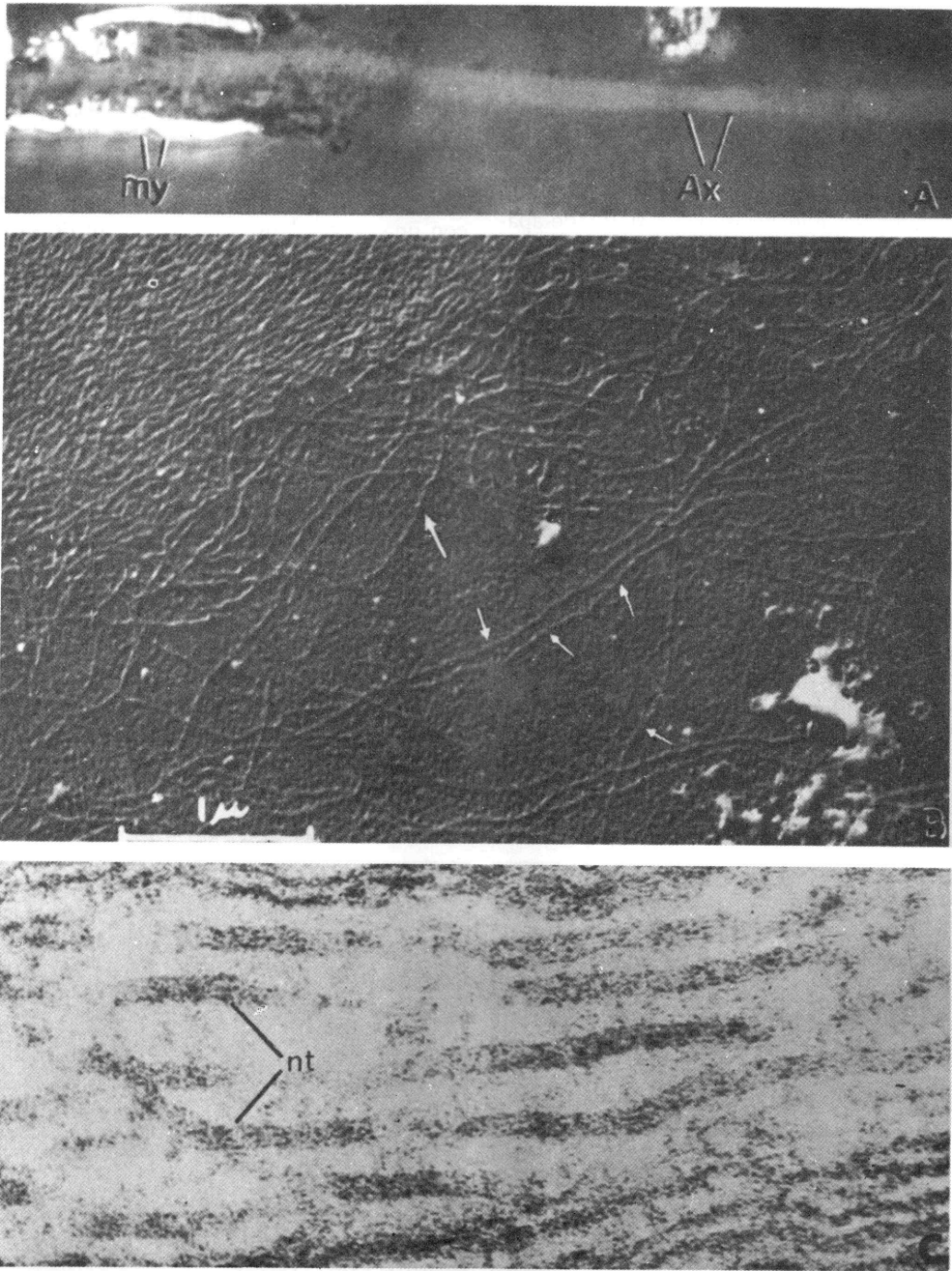


FIG. 5-3. A. Axón (Ax) separado de una fibra mielínica y observado con el microscopio de polarización. Nótese la débil birrefringencia positiva debida al ordenamiento microtubular. Con un tratamiento apropiado se puede demostrar que la birrefringencia es tanto de forma como intrínseca. my, mielina con fuerte birrefringencia. En la fibra entera, la birrefringencia del axón está oscurecida por la de la vaina de mielina. (De W. Thornburg y E. De Robertis, 1956.) B. Material fibrilar (microtúbulos y neurofilamentos), observado con el microscopio electrónico, de un axón despojado de la vaina de mielina y comprimido. Preparación sombreada con cromo. Se indican con flechas algunos microtúbulos. 26.000×. (De E. De Robertis y C. M. Franchi, 1953.) C. Microtúbulos (neurotúbulos) orientados longitudinalmente (nt). 120.000×. (Cortesía de E. L. Rodríguez Echandía, R. S. Piezzi y E. M. Rodríguez.)

descriptos hace relativamente poco tiempo, algunas de las estructuras que forman (husos mitóticos, rayos astrales de células en división, elementos lon-

gitudinales de los axones y de flagelos) ciertamente fueron observadas por los primeros citólogos, que con el microscopio óptico sólo pudieron identificar

como "filamentos" o "fibrillas" lo que el microscopio electrónico demuestra que son disposiciones paralelas de microtúbulos.

Las primeras observaciones de lo que hoy sabemos que son microtúbulos individuales fueron realizadas en 1953 por De Robertis y Franchi con la técnica del sombreado en el axoplasma separado de fibras nerviosas mielínicas (fig. 5-3), donde aparecían como elementos cilíndricos alargados, no ramificados, de 20 a 30 nm de diámetro y longitud indefinida.

La mayoría de los microtúbulos son muy lábiles y no pueden resistir los efectos de agentes fijadores como el tetróxido de osmio, que fue de uso universal en microscopía electrónica hasta que en 1963 se introdujo el glutaraldehído como fijador primario. Desde entonces pudo intensificarse el estudio de estas estructuras con la microscopía electrónica.

El desarrollo de las técnicas de inmunocitoquímica también posibilitó la identificación de las características y distribución de los microtúbulos con la microscopía óptica en la casi totalidad de las células eucarióticas (fig. 5-4), donde poseen una variedad sorprendente de funciones que van más allá de un simple papel estructural. Unos pocos tipos celulares, como los eritrocitos, carecen de microtúbulos.

5-7. Todos los microtúbulos poseen una organización morfológica semejante

Los microtúbulos son de tamaño uniforme y notablemente rectilíneos. Tienen alrededor de 25 nm de diámetro externo y un largo que puede alcanzar más de 20 μm en algunos axones. En los cortes transversales muestran una configuración anular, con una pared densa de unos 6 nm de espesor y un centro más claro (fig. 5-5, A).

Cada microtúbulo está rodeado por una zona "de exclusión" de baja densidad electrónica, que carece de ribosomas y de otras partículas.

La pared de un microtúbulo está integrada por subunidades globulares, de diámetro aproximado de 5 nm, que se disponen en 13 columnas longitudinales (protofilamentos) que rodean a un centro aparentemente hueco. Ocasionalmente se han detectado puntos densos en la porción central de algunos microtúbulos (fig. 5-5, B y C).

5-8. La tubulina es la principal proteína de los microtúbulos

Los microtúbulos están compuestos por proteínas, de las cuales la *tubulina* constituye aproximadamente el 85% del total. El resto está representado por las llamadas *proteínas microtubulares asociadas* o MAPs.

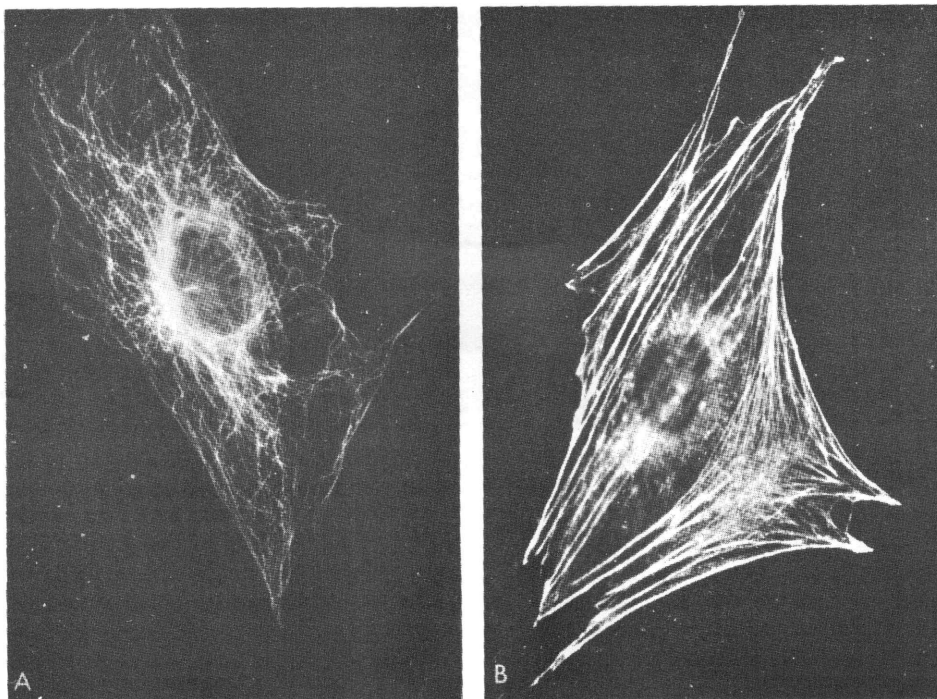


FIG. 5-4. Células 3T3 cultivadas y coloreadas por inmunofluorescencia con anticuerpos contra tubulina (A) y actina (B). 600 $\times$. (Cortesía de M. Osborn y K. Weber, 1976.)

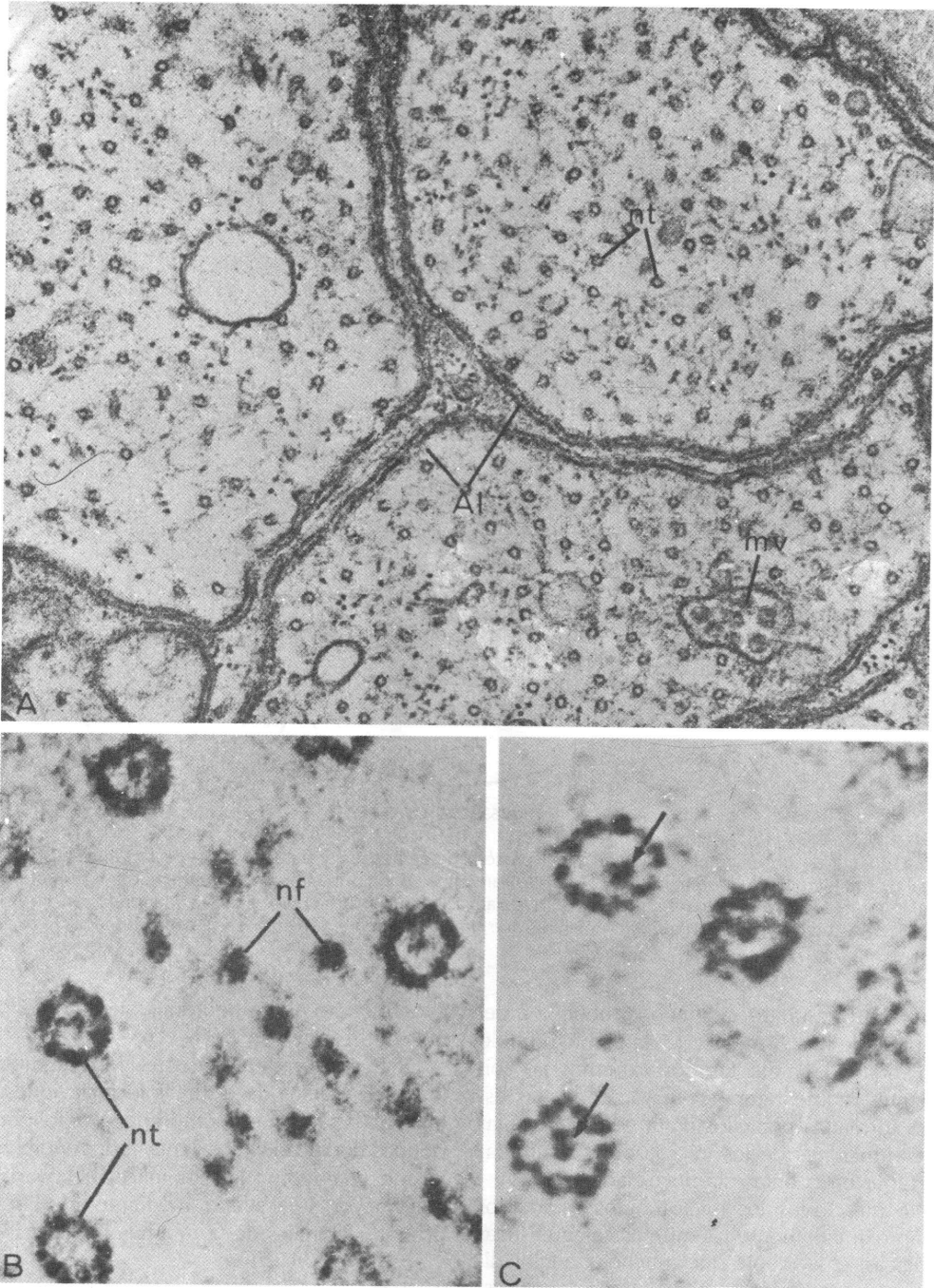


FIG. 5-5. **A.** Corte de un nervio amielínico que pone de manifiesto parte de tres axones con su membrana plasmática o axolema (Al), los microtúbulos (nt) y un cuerpo multivesicular (mv). 60.000 $\times$. **B.** Con mayor aumento se observan filamentos intermedios (nf) y microtúbulos (nt). 400.000 $\times$. **C.** Se indican con flechas los microtúbulos que contienen gránulos en su luz. 600.000 $\times$. (Cortesía de E. L. Rodríguez Echandía, R. S. Piezzi y E. M. Rodríguez.)

La tubulina es un heterodímero constituido por dos subunidades de 50 kDa, denominadas tubulina α y tubulina β , que se asocian en una unidad estructural de 8 nm de largo (la tubulina $\alpha\beta$, o simplemente tubulina) que se une en tándem con otras

semejantes para constituir los protofilamentos, que a su vez están asociados para formar el microtúbulo. Cabe destacar que las unidades diméricas se ordenan siempre "cabeza con cola", vale decir que a lo largo del protofilamento la tubulina α de un

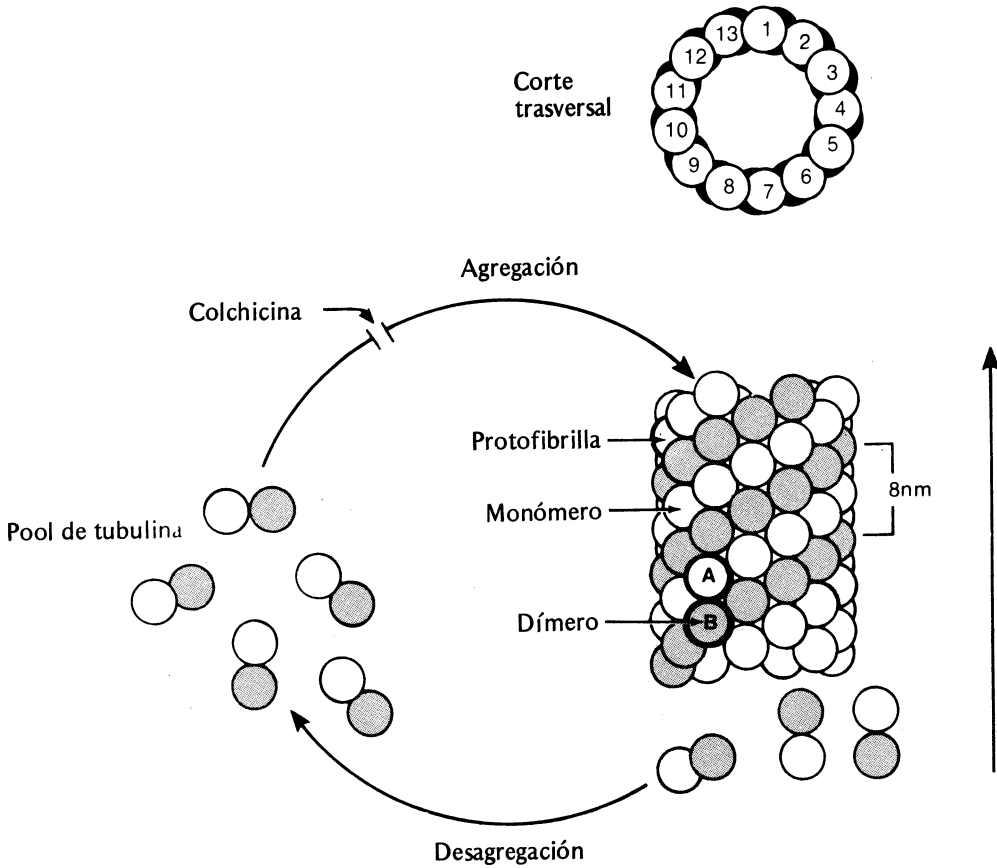


FIG. 5-6. Esquema de un microtúbulo aislado y del proceso de agregación y desagregación de la tubulina. **Arriba.** Corte transversal de un microtúbulo, que muestra los 13 protofilamentos. **Abajo.** Vista longitudinal que muestra los protofilamentos helicoidales formados por dímeros de tubulina y la polarización del microtúbulo. En esta interpretación tradicional, el microtúbulo se desagrega en la parte inferior mientras que simultáneamente se agrega en la parte superior.

dímero siempre está asociada con la tubulina β del que le precede (fig. 5-6). Esto le da al microtúbulo una polaridad definida: los dos extremos no son equivalentes, como tampoco lo son todas las estructuras formadas por ellos. Para comprender las múltiples funciones de los microtúbulos es fundamental tener en cuenta esta polaridad.

Pese a que todos los microtúbulos estudiados tienen aproximadamente las mismas características morfológicas, es evidente que muchos de ellos difieren en sus propiedades, por ejemplo, en su estabilidad. Así, los microtúbulos que forman los cilios y los flagelos son estructuras muy estables, mientras que los que constituyen el huso mitótico son lábiles y transitorios. Los microtúbulos que componen el citoesqueleto también son estructuras en general efímeras, que se encuentran en equilibrio dinámico con una gran reserva citosólica de tubulina soluble: algunos de ellos se forman y desaparecen en cuestión de minutos, mientras que otros persisten varias horas; en el caso especial del

citoesqueleto de las neuronas, su vida media es de más de tres meses.

De hecho, existen diferentes tipos de tubulina en los microtúbulos de distintas localizaciones. La familia de la tubulina α comprende por lo menos seis isotipos codificados por genes independientes, y lo mismo sucede con la tubulina β . Una variabilidad aún mayor se obtiene mediante modificaciones postraduccionales de la tubulina α .

5-9. Los microtúbulos se forman a partir de centros organizadores (COMTs)

En muchos tipos celulares, aproximadamente la mitad de la tubulina forma parte de los microtúbulos mientras que la otra mitad está en su forma libre en el citosol.

El montaje de los microtúbulos a partir de la tubulina soluble es un proceso orientado y programado. Dentro de la célula existen *centros organizadores de microtúbulos* (COMTs), representados

fundamentalmente por los *centrosomas* y por los *cinetosomas* o *cuerpos basales* de los cilios, a partir de los cuales se produce el brote microtubular.

El comienzo de la formación de un microtúbulo nuevo se denomina *nucleación*, y es un proceso más lento que el agregado de tubulina para su crecimiento (*elongación*). La nucleación parece requerir de un tipo especial de tubulina, la tubulina γ , que se encuentra en el material pericentriolar de los centrosomas.

En la célula en interfase, como vimos, los microtúbulos del citoesqueleto están en equilibrio dinámico con las subunidades diméricas, pero no se conocen en detalle los factores que regulan ese equilibrio de modo de producir polimerización o despolimerización microtubular en diferentes etapas fisiológicas de la célula, ni de qué manera se logra la estabilidad de algunos microtúbulos tales como los ciliares o los neuronales.

5-10. Los microtúbulos son estructuras polarizadas y muestran una inestabilidad dinámica

Es posible sintetizar o elongar microtúbulos *in vitro* a partir de soluciones purificadas de tubulina, a 37°C, en presencia de GTP y Mg^{2+} . En estas condiciones, una vez formado el microtúbulo, éste crece dos a tres veces más rápido en uno de sus extremos que en el otro. El extremo de crecimiento rápido se denomina *extremo más* [+] (*plus* en inglés), mientras que el de crecimiento lento es el *extremo menos* [-] (*minus* en inglés).

En la célula todos los microtúbulos están orientados de modo tal que los extremos [-] se localizan alrededor de los COMTs (centrosomas o cuerpos basales) y los extremos [+] se dirigen hacia la periferia celular (fig. 5-7). Si se observa una célula viviente mediante la técnica microscópica de contraste diferencial videointensificado (cap. 3-1), es posible visualizar a los microtúbulos individuales, y éstos poseen un comportamiento notable: se los ve elongarse a partir del centrosoma, para luego detener su crecimiento y acortarse hasta desaparecer, o bien retomar el crecimiento nuevamente. Al conjunto de estas variaciones, que se producen continuamente e implican rápidos cambios de polimerización-despolimerización, se lo denomina *inestabilidad dinámica* de los microtúbulos. Esta inestabilidad característica permite la rápida redistribución de los microtúbulos citoesqueléticos, lo cual es de suma importancia para las células que cambian de forma, se mueven o se dividen.

Cabe notar que en la célula viva el extremo de los microtúbulos que experimenta cambios de crecimiento-acortamiento es el extremo [+], ya que el extremo [-] suele estar bloqueado por los COMTs;

generalmente se los ve terminar en el material pericentriolar de los centrosomas o en la placa basal de los cinetosomas.

5-11. La elongación microtubular depende del agregado de tubulina-GTP

El proceso de crecimiento microtubular requiere de la provisión del dímero soluble de tubulina unido a dos moléculas de GTP. Uno de los GTP permanece siempre unido sin cambios a la tubulina α (por lo cual no lo tendremos más en cuenta), mientras que el otro se une a la tubulina β y es hidrolizado.

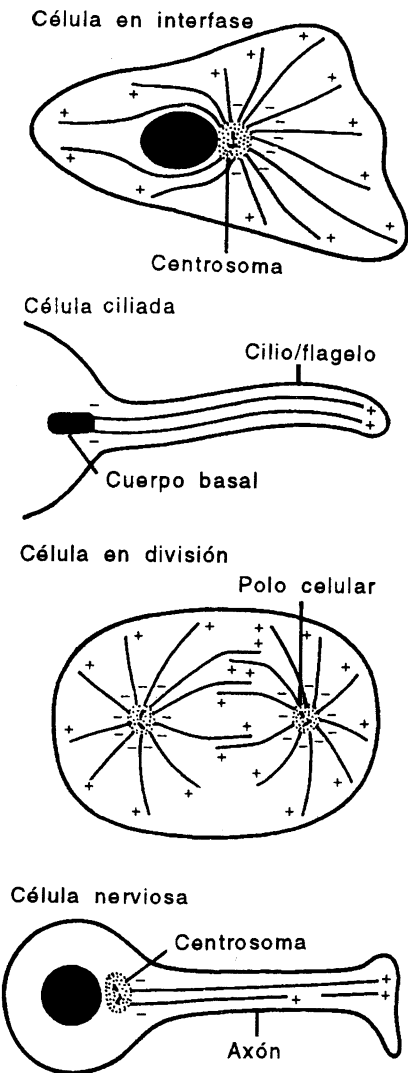


FIG. 5-7. Esquema que muestra la disposición y orientación de los microtúbulos, con sus extremos [-] en los centros organizadores microtubulares y los extremos [+] cerca de la membrana plasmática. (De B. Alberts et al. [1994] *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed.)

zados a GDP inmediatamente después de que el dímero es incorporado al extremo $[+]$ del microtúbulo. Los dímeros que poseen GTP se unen entre sí con mucha mayor afinidad que a los que poseen GDP; se comprende entonces que si la oferta de tubulina-GTP se efectúa antes que el GTP terminal del microtúbulo sea hidrolizado, se incorpora un nuevo dímero al microtúbulo, y así sucesivamente, con su consiguiente crecimiento. Por lo contrario, la afinidad entre los dímeros de tubulina-GDP es relativamente baja y éstos tienden a disociarse, con acortamiento del microtúbulo (fig. 5-8).

En ausencia de factores externos que bloqueen los cambios del extremo $[+]$, los microtúbulos oscilan entonces entre dos estados posibles, característicos de la inestabilidad dinámica: crecimiento cuando existe un "capuchón" de tubulina-GTP aún no hidrolizada en el extremo del microtúbulo, además de una alta concentración de tubulina-GTP soluble, o acortamiento en el caso contrario.

Se cree que ciertas modificaciones de la tubulina posteriores a su polimerización, en particular la acetilación o la destirosinación, podrían promover la estabilidad ulterior de los microtúbulos, tal vez induciendo su unión a las MAPs.

5-12. Ciertas drogas interfieren en la polimerización o despolarización de la tubulina

Cada heterodímero de tubulina es capaz de ligarse a una molécula del alcaloide *colchicina* o de su derivado *colcemid*, y evita así su agregado a los extremos $[+]$ de los microtúbulos, lo que provoca la rápida desaparición de microtúbulos, en particular los del huso mitótico. Esta propiedad también la poseen los alcaloides de la *Vinca*, como la *vinblastina* y la *vincristina*, que se utilizan en medicina como drogas antimitóticas en el tratamiento antitumoral.

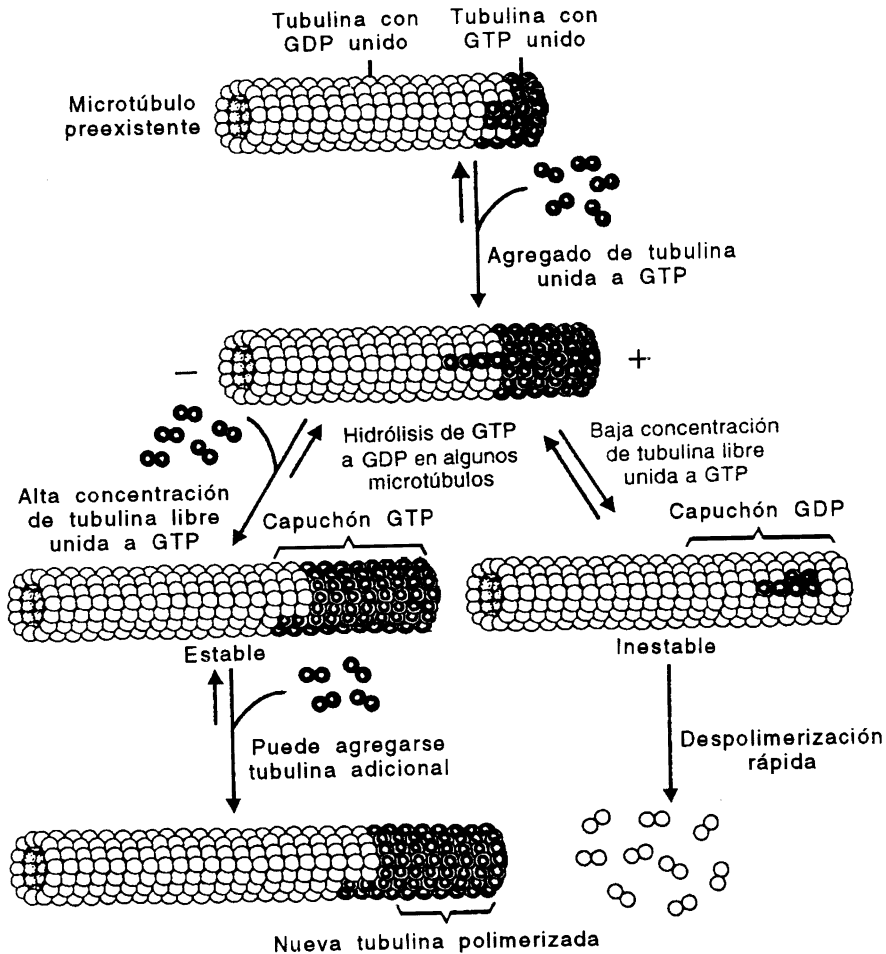


FIG. 5-8. Esquema del crecimiento y acortamiento microtubular de acuerdo con la inestabilidad dinámica. El extremo $[-]$ está estabilizado por el material pericentriolar, de modo que los cambios son evidentes sólo en los extremos $[+]$. Los dímeros de tubulina unidos a dos moléculas de GTP se representan oscuros. Véanse los detalles del proceso en el texto.

Como se verá en el capítulo 10, la realización del *cariotipo* incluye el empleo del colcemid, ya que la desintegración del huso mitótico permite obtener una gran cantidad de células detenidas en la metafase mitótica, que es la etapa más favorable para el estudio cromosómico.

El *taxol* posee una acción opuesta a la de la colchicina, ya que se une a los microtúbulos e impide la despolimerización de la tubulina. Esta acción igualmente interfiere en la separación cromosómica de la mitosis, y por esta razón también es utilizado en el tratamiento antineoplásico.

5-13. Las proteínas microtubulares asociadas (MAPs) son componentes importantes de los microtúbulos

Aproximadamente del 5 al 15% del contenido proteico de los microtúbulos está constituido por estos polipéptidos, algunos de los cuales poseen un papel estructural y estabilizan las relaciones de los microtúbulos entre sí, así como las de éstos con los demás componentes celulares. Otras MAPs actúan como proteínas motoras, promoviendo el transporte a lo largo de los microtúbulos.

Las MAPs de las neuronas comprenden dos familias principales, cada una de ellas con varios miembros: las de alto peso molecular (que incluyen a la *MAP 1* de axones y dendritas y a la *MAP 2* que se encuentra en las dendritas) y las de bajo peso (o *proteínas tau* [τ] de los axones). Se cree que algunas de estas proteínas forman las pequeñas proyecciones laterales visibles con la microscopia electrónica, que se escalonan a intervalos regulares de 32 nm a todo lo largo de los microtúbulos, conectándolos entre sí y con los filamentos intermedios (fig. 5-9). Otras (como la *MAP 1C*) conectan a los microtúbulos con vesículas, a las que transportan a lo largo de aquéllos.

Una de las proteínas τ es una proteína fijadora de la calmodulina, que puede formar un complejo con ésta en presencia de pequeñas concentraciones de calcio. Este complejo es reversible y contribuye a la regulación de la agregación y disgregación de la tubulina en el microtúbulo. Se sabe que el aumento en la concentración del calcio inhibe la formación microtubular.

Algunas de las MAPs están fosforiladas, lo que sugiere un posible ciclo de fosforilación-desfosforilación en la regulación del ordenamiento microtubular.

Recientes experiencias indican que en la enfermedad de Alzheimer (una forma de demencia) las fosfatasa encargadas de desfosforilar a las proteínas τ neuronales están muy disminuidas o ausentes. Las proteínas τ hiperfosforiladas serían incapaces de mantener el ordenamiento microtubular, lo cual in-

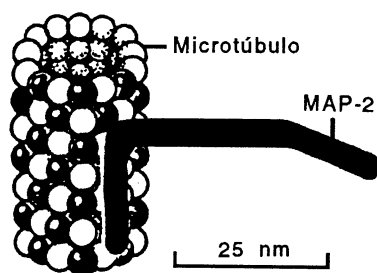


FIG. 5-9. Esquema de una porción de un microtúbulo del que irradia una proteína microtubular asociada del tipo de las MAP 2.

terfiría en el transporte axónico y dendrítico (véase más abajo), y con el tiempo se acumularían y precipitarían como un material filamentososo en el citosol neuronal. Se sugirió que este descenso de la actividad fosfatásica en el síndrome de Alzheimer no sería la causa de la enfermedad, sino el resultado de un efecto neurotóxico de origen génico.

5-14. Las proteínas motoras mueven materiales sobre la superficie de los microtúbulos

El rápido transporte de macromoléculas y de orgánulos de una parte a otra de la célula implica el movimiento guiado por elementos citoesqueléticos, en particular por los microtúbulos que irradian desde el centrosoma hacia la periferia celular. Como se verá en el capítulo 8, en muchos tipos celulares el complejo de Golgi se ubica en las inmediaciones del centrosoma, lo que pone en relación de vecindad a las vesículas secretorias o de transporte intercelular con el origen de los manojos de microtúbulos que se dirigen hacia la superficie de la célula. Esto brinda un soporte físico o "pista" estacionaria sobre la cual un tipo especial de MAPs, las *proteínas motoras* o *ATPasas microtubulares asociadas*, unen y mueven a los materiales. La colchicina inhibe este transporte, lo que demuestra la necesidad de la integridad microtubular para que aquél se produzca. También depende imperativamente del metabolismo oxidativo, dado que las proteínas motoras son ATP-dependientes o GTP-dependientes.

La velocidad de desplazamiento de las partículas en este tipo de transporte es muy alta: en algunos casos alcanza más de 3 $\mu\text{m}/\text{seg}$. Resulta realmente impresionante el veloz desplazamiento de los gránulos citoplasmáticos (que se mueven por este mecanismo) cuando se observan células vivas —por ejemplo del tipo de los leucocitos— con el microscopio de contraste de fases. Este desplazamiento de los gránulos de los leucocitos está muy alterado en el síndrome congénito de *Chédiak-Higashi*, cau-

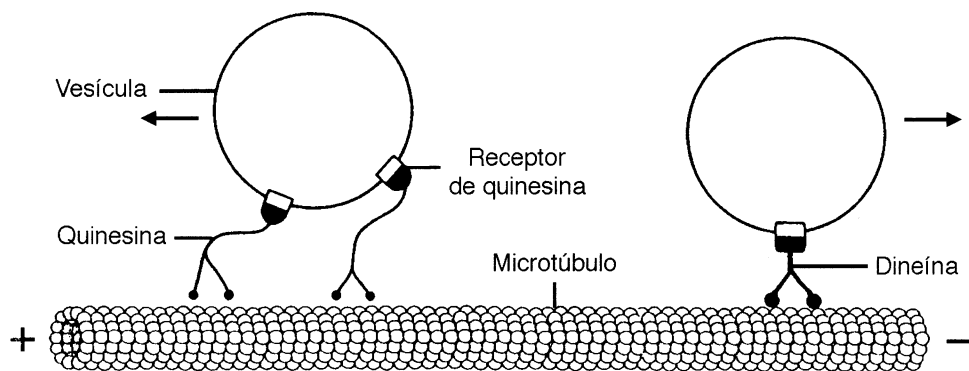


FIG. 5-10. Esquema del transporte vesicular por medio de proteínas motoras que se desplazan sobre la superficie microtubular. A la izquierda, la quinesina se mueve hacia el extremo [+], y a la derecha la dineína citoplasmática o MAP 1C se mueve hacia el extremo [-]. Ambas proteínas poseen un extremo que se une a una molécula receptora en la vesícula transportada y otro que se une al microtúbulo y posee acción ATPásica. (Modificado de R. D. Vale et al. [1985].)

sado por alteraciones microtubulares que determinan una menor capacidad de destruir a las bacterias fagocitadas.

Existen cuatro grupos de proteínas motoras: 1) quinesinas; 2) dineínas citoplasmáticas; 3) dineína ciliar y flagelar, y 4) dinamina. Las dos primeras mueven partículas a lo largo de microtúbulos. Las dos últimas desplazan microtúbulos entre sí.

1) Las *quinesinas* son ATPasas microtubulares compuestas por dos subunidades pesadas (α) y por lo menos dos livianas (β). La holoenzima tiene un peso molecular de alrededor de 270 kDa. Existen muchas clases de quinesinas en diferentes tipos celulares, y en una misma célula coexisten varias, cada una de ellas encargada del transporte de un tipo de estructura.

Las cadenas pesadas poseen un dominio globular, de acción ATPásica, que se une a la superficie microtubular y se desplaza por ésta hacia el extremo [+] con gasto de energía. Los dominios no globulares y las cadenas livianas, a su vez, se unen a componentes celulares específicos (fig. 5-10).

2) Las *dineínas citoplasmáticas* o *MAP 1C* también están representadas por varios miembros, de gran peso molecular. Sus características funcionales son semejantes a las de las quinesinas, con la diferencia principal de que realizan el transporte hacia el extremo [-] de los microtúbulos.

3) La *dineína ciliar* es la responsable del desplazamiento microtubular en el movimiento ciliar y flagelar. Será analizada en la sección correspondiente.

4) La *dinamina* se diferencia de las anteriores porque es una GTPasa. Inicialmente se la describió en las neuronas, donde parece relacionar microtúbulos vecinos entre sí, promoviendo su desplazamiento y por lo tanto la elongación de manojos microtubulares, lo que a su vez induciría el alarga-

miento o crecimiento de la prolongación neuronal. Se cree que proteínas similares también intervienen en la elongación anafásica de las células mitóticas.

5-15. Los microtúbulos citoplasmáticos cumplen diversas funciones

Los microtúbulos son estructuras ubicuas sumamente versátiles. Existe una larga lista de funciones relacionadas con ellos:

Función mecánica. Suele atribuirse a los microtúbulos la función de proporcionar por sí mismos un citoesqueleto a la célula. De ser así, sin duda éste sería un esqueleto muy inestable, ya que (salvo contadas excepciones) sus componentes pueden disgregarse en cuestión de minutos para luego volver a reconstituirse, a menudo en estructuras completamente nuevas. Además, las propiedades mecánicas de los microtúbulos hacen que el sistema microtubular sea fácilmente deformable y en especial poco adaptado para soportar tensiones. Este papel, como veremos más adelante en este capítulo, es casi privativo de los filamentos intermedios.

Morfogénesis. El papel de los microtúbulos en la adquisición de la forma durante la diferenciación celular está relacionado con el crecimiento orientado de aquéllos. Por ejemplo, el alargamiento de las células durante la inducción de la placoda del cristalino se acompaña del crecimiento de numerosos microtúbulos. Otro caso es el de las transformaciones morfogénicas durante la espermiogénesis. En el citoplasma de las espermátidas aparece una gran cantidad de microtúbulos, asociados en una estructura cilíndrica llamada vaina caudal, cuyos extremos [-] se ubican cerca de la superficie nuclear mientras que los extremos [+] crecen caudalmente al tiempo que el citoplasma se alarga y estrecha.

La forma de algunas prolongaciones o protuberancias celulares se correlaciona con la orientación y distribución de los microtúbulos. Esto es bastante notorio en los axones y las dendritas, donde los haces orientados de microtúbulos ("neurotúbulos") son considerados como un almacén que interactúa con los filamentos ("neurofilamentos") para modelar a la célula.

Polarización y motilidad celular. La organización básica del citoplasma celular está dada por el centrosoma (véase más abajo), desde donde irradian ordenadamente microtúbulos polarizados, los que a su vez organizan la distribución de los filamentos (intermedios y de actina) y se relacionan con ellos. La ubicación y los movimientos de los orgánulos citoplasmáticos, a su vez, dependen de la trama citoesquelética en conjunto.

Transporte intracelular. Como ya vimos al tratar las proteínas motoras, los microtúbulos actúan como un soporte o carril por la superficie del cual dichas proteínas transportan diversas estructuras. Este sistema está bien desarrollado en casi todos los tipos celulares eucarióticos, pero tal vez donde mejor se lo estudió fue en los axones. En estas estructuras los microtúbulos son los responsables del de-

nominado *flujo axónico rápido* (también existe un flujo dendrítico) que es bidireccional (fig. 5-11).

El *flujo axónico rápido anterógrado* o *centrífugo* transporta materiales (vesículas, retículo liso, componentes de las vesículas sinápticas, factores tróficos y gran cantidad de glucoproteínas) desde el soma neuronal hacia el terminal axónico. Como es de suponer, el movimiento lo efectúan las quinesinas —recuérdese que el extremo [+] siempre está dirigido hacia la membrana plasmática, en este caso hacia la membrana sináptica—.

El *flujo axónico rápido retrógrado* o *centrípeto* mueve lisosomas, vesículas recubiertas que se reciclan, neurovirus, etc. En este caso el transporte hacia el centrosoma neuronal lo efectúan las MAP 1C o dineínas citoplasmáticas.

Un caso especial de transporte intracelular lo constituye el movimiento anafásico de los cromosomas hacia los polos celulares. Las funciones de los microtúbulos en este traslado serán analizadas en el capítulo 15.

Motilidad. La estructura fundamental de los cilios y flagelos está dada por una disposición ordenada de microtúbulos denominada axonema (véase la sección que sigue).

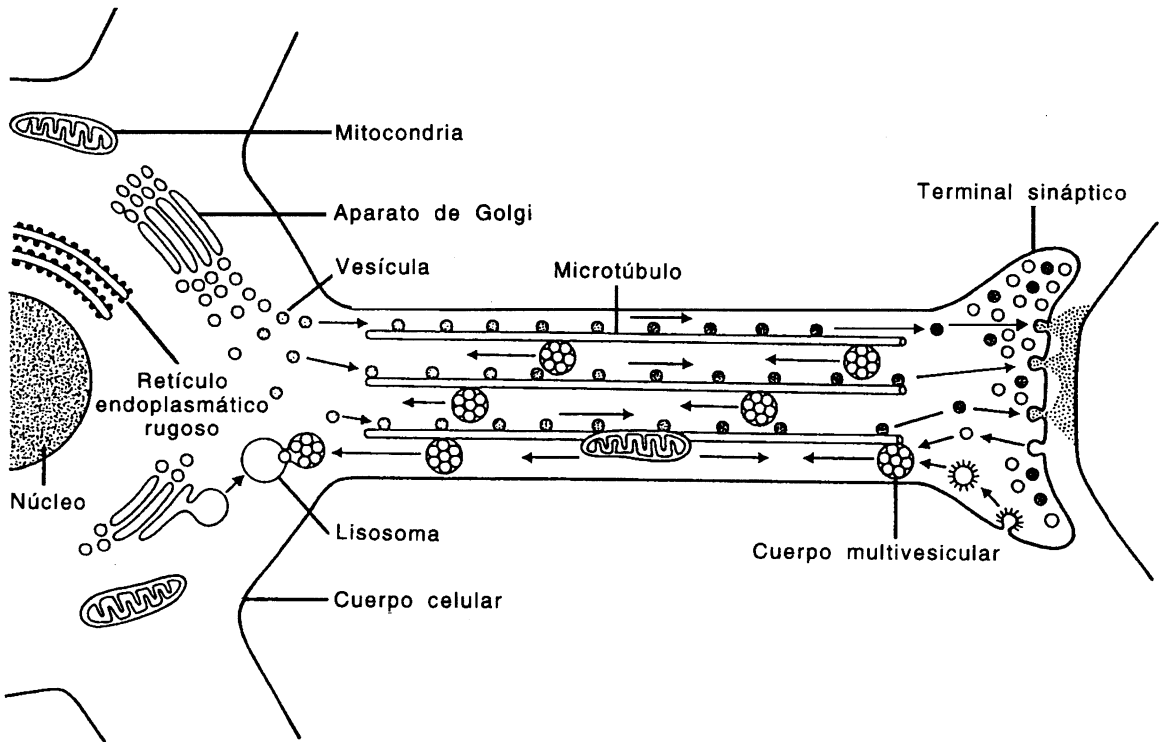


FIG. 5-11. Esquema del transporte mediado por microtúbulos en el axón (flujo axónico). Las vesículas sinápticas son producidas en el aparato de Golgi y conducidas por las quinesinas hasta las terminaciones sinápticas, siguiendo el trayecto de los microtúbulos ("neurotúbulos"), junto con otros elementos, como las mitocondrias. La membrana presináptica se reutiliza en varios ciclos de recarga, y finalmente es reciclada y transportada centrípetamente hasta las inmediaciones del Golgi por la dineína citoplasmática (flujo axónico retrógrado). (Modificado de A. D. Iselin.)

ORGANOIDES MICROTUBULARES: CENTROSONA, CILIOS Y FLAGELOS

5-16. El centrosoma es una zona del citoplasma que contiene un par de centríolos

Hace más de un siglo, los microscopistas reconocieron que en el citoplasma de la mayor parte de las células animales teñidas con colorantes como la hematoxilina férrica existía un par de bastoncitos diminutos, apenas sobre el límite de resolución del microscopio óptico, denominados *centríolos*, que se ubicaban en una zona especial del citoplasma yuxtannuclear, de límites difusos y siempre desprovista de otros organoides y partículas, denominada *centro celular* o *centrosoma*.

La posición del centrosoma, cuyo nombre es descriptivo, es utilizada desde hace largo tiempo como indicativa de la simetría y polaridad de la célula. Una línea imaginaria trazada a través del centro geométrico del núcleo celular y que pasa por el centrosoma fue definida como el *eje celular*. En las células epiteliales glandulares exocrinas la posición del centrosoma es supranuclear, parcialmente rodeado por el aparato de Golgi. En la mayor parte de las células, la relación entre centrosoma y Golgi es estrecha.

El microscopio electrónico permitió aclarar la estructura del centrosoma. Está constituido por el *par de centríolos* (o *diplosoma*) y una zona imprecisa que contiene los llamados *satélites centriolares* o

material pericentriolar, de naturaleza desconocida, donde se insertan los extremos [-] de los microtúbulos que irradian desde el centrosoma. Las células de los vegetales superiores y de ciertos protozoos poseen un centro organizador de microtúbulos (COMT) algo difuso, que carece de centríolos en su interior. Parece ser entonces que el material pericentriolar del centrosoma, y no los centríolos, representa el COMT de la célula.

Los centríolos mismos están constituidos por microtúbulos. Son dos cilindros huecos, perpendiculares entre sí, que miden $0,2 \times 0,5 \mu\text{m}$ en promedio, aunque a veces pueden alcanzar hasta $2 \mu\text{m}$ de longitud. Sus paredes están formadas por nueve conjuntos triples de microtúbulos fundidos entre sí (*tripletes microtubulares*), con una inclinación característica hacia el centro. Cada unidad formada por el triplete se llama también *hoja centriolar*. Dentro de cada hoja los microtúbulos describen una trayectoria suavemente helicoidal. Como se muestra en la figura 5-12, los microtúbulos de cada triplete se denominan A, B y C.

Cada triplete aparece relacionado con los que lo flanquean por conexiones proteicas que mantienen unido al conjunto de nueve tripletes. Los dos extremos de cada centríolo se encuentran abiertos, aunque en ocasiones se puede identificar una estructura radial que conecta cada triplete con una densidad central, cerca de uno de los extremos del cilindro denominado *extremo proximal*.

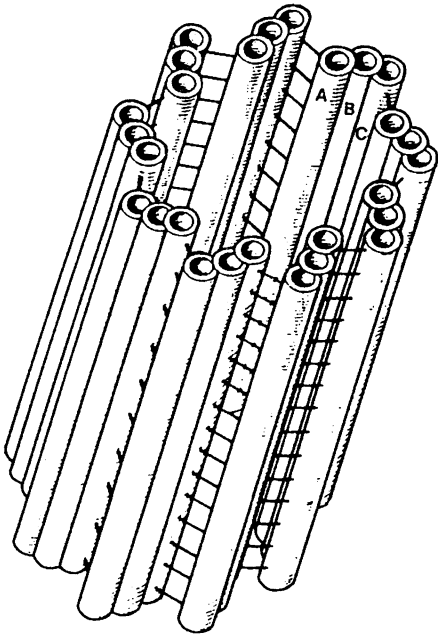


FIG. 5-12. Esquema de uno de los miembros del par de centríolos. (Modificado de Junqueira.)

5-17. Los centríolos se replican a sí mismos

Inmediatamente antes de la etapa S del ciclo celular, cada centríolo se autoduplica originando un brote microtubular perpendicular a sus paredes (*procentríolos*), de modo que en la etapa G₂ la región centrosómica ya contiene dos pares de centríolos, que se separan y migran hacia lo que serán los polos celulares en la etapa M del ciclo, donde a partir del material pericentriolar se organizan los microtúbulos del huso mitótico o meiótico y de los ásteres (fig. 5-14) (cap. 15).

Las células diploides contienen por lo general un solo par de centríolos, aunque en las células poliploides o multinucleadas suele existir un diplosoma por cada juego de cromosomas. La mayor parte de los megacariocitos de la médula ósea, por ejemplo, posee 8 pares centriolares, ya que la ploidía del 75% de estas células (determinada por citoespectrofotometría) es de 16n.

Una excepción a esta regla la constituyen las células ciliadas al comienzo de su diferenciación, en las cuales se forman decenas o centenares de centríolos, que toman posición inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, perpendiculares a ella, donde forman *cinetosomas* o *cuer-*

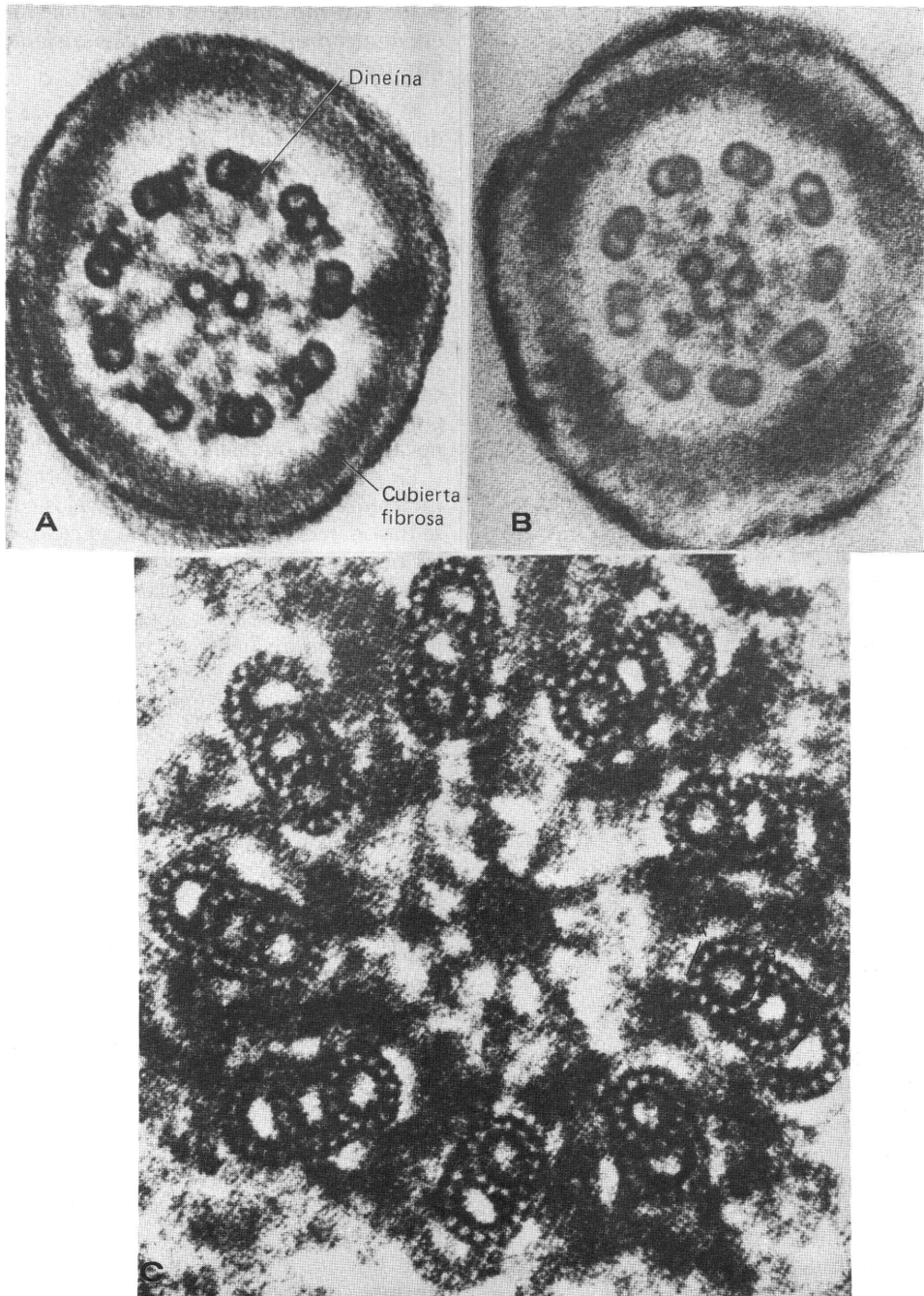


FIG. 5-13. A. Micrografía electrónica de un corte transversal de la cola de un espermatozoide humano normal. Obsérvese la presencia de brazos de dineína adheridos al microtúbulo A y la vaina fibrosa alrededor del axonema (esta vaina está presente sólo en el flagelo del espermatozoide y no de los cilios). B. Igual que la anterior, pero de un individuo con el síndrome de Kartagener. Obsérvese la falta de brazos de dineína. (Cortesía de B. A. Afzelius.) C. Corte transversal de un centríolo coloreado con ácido tánico, que muestra los tripletes con los protofilamentos de tubulina en coloración negativa. Obsérvese que el túbulo A tiene 15 protofilamentos y el B y el C únicamente 10. (Micrografía de Vitaus Kalnis, tomada de D. W. Fawcett [1981] The Cell. Saunders.)

pos basales a partir de los cuales se originan los cilios.

En algunos tipos celulares los centríolos no pare-

cen brotar de otros preexistentes sino que se originan, de manera desconocida, a partir de un material granuloso en el citoplasma.

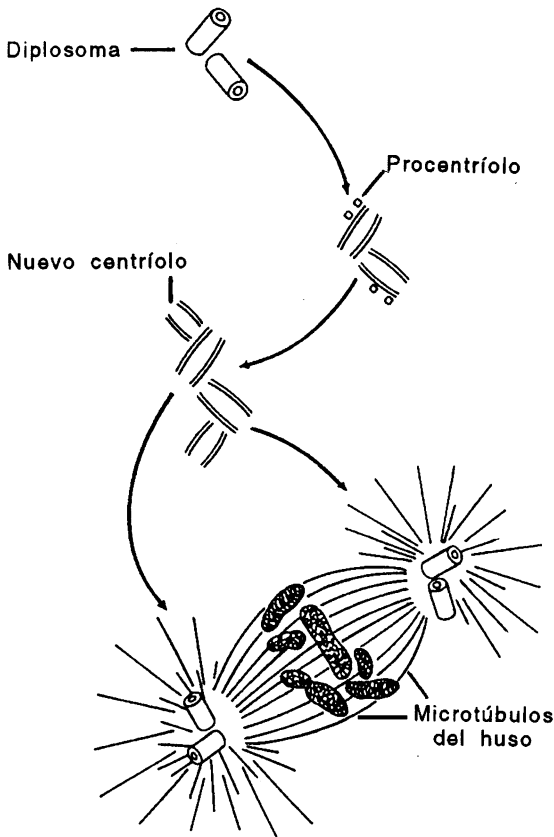


FIG. 5-14. Esquema de la replicación centriolar previa a la división celular. Cada miembro del diplosoma o par centriolar original induce el brote perpendicular de un nuevo centriolo. (Tomado de D. W. Fawcett [1981] *The Cell*, 2nd ed. W. B. Saunders.)

5-18. La organización básica del citoplasma celular está dada por el centrosoma

Como ya vimos al analizar sus funciones generales, el patrón arquitectónico básico del citoplasma está dado por la trama de microtúbulos del citoesqueleto, que a su vez organiza a los otros componentes filamentosos de éste y condiciona la forma, polaridad y distribución de los orgánoides de la célula.

Una observación curiosa, de interpretación funcional desconocida pero que podría ejemplificar el papel organizador del centrosoma en la polaridad celular, es que en la casi totalidad de las células endoteliales de las arterias aquél está localizado en la porción citoplasmática proximal (la que está más cerca del corazón), mientras que en el endotelio venoso el centrosoma se ubica en el citoplasma distal (que en las venas también es el más cercano al corazón).

5-19. Los movimientos ciliar y flagelar se encuentran en diversas células aisladas o que forman tejidos

El movimiento ciliar está adaptado al medio líquido y es cumplido por pequeños apéndices especialmente diferenciados, de número y tamaño variables, que reciben el nombre de *flagelos* si son largos y escasos (generalmente uno o dos) y *cilios* (o cilias) si son cortos y numerosos. En los protozoos, particularmente en los infusorios, hay centenares o miles de pequeños cilios con los cuales se desplazan.

En regiones especiales de estos infusorios, ciertos cilios se fusionan y forman apéndices cónicos más gruesos denominados *cirros*, o las membranas conocidas como *ondulantes*.

En los protozoos, toda la clase *Mastigophora* se caracteriza por la presencia de flagelos con los que se trasladan en alguna etapa de su ciclo vital. Entre los metazoos, solamente los espermatozoides tienen la propiedad de desplazarse como células libres por medio de estos apéndices. En cambio, es relativamente frecuente encontrar células epiteliales provistas de cilios, capaces de constituir verdaderas láminas ciliadas que pueden cubrir grandes áreas de la superficie del animal, y que posibilitan su movimiento. Tal es el caso de algunos platelmintos y nemertinos, y también el de las larvas de equinodermos, moluscos y anélidos.

Con mayor frecuencia, las células epiteliales ciliadas revisten cavidades o tubos internos, como las de las vías aéreas superiores o las de las trompas uterinas, donde los 100 a 300 cilios de cada célula se mueven coordinadamente en la misma dirección y producen corrientes líquidas en la superficie epitelial. Estas corrientes sirven para eliminar partículas sólidas en suspensión, como en el caso del epitelio respiratorio, o para trasladar células, como en el oviducto.

APARATO CILIAR

Los componentes esenciales del aparato ciliar son:

a) el *cilio*, prolongación cilíndrica delgada que se proyecta desde la superficie libre de la célula; está constituido por un axonema inmerso en la matriz ciliar y envuelto por la membrana ciliar;

b) el *cuerpo basal* o *cinetosoma*, organoide intracelular semejante al centriolo, a partir del cual brota el cilio, y

c) las *raíces ciliares* o *raicillas ciliares*, formadas por finas fibrillas que existen en algunas células, en las que surgen de los cinetosomas para convergir en un haz cónico cuyo vértice termina a un lado del núcleo.

5-20. El axonema contiene un patrón microtubular doble de $9 + 2$

Se denomina *axonema* a la estructura interna axil de cilios y flagelos, básicamente microtubular, que constituye el elemento esencial para la motilidad. La longitud del axonema es de varios micrómetros en los cilios y puede llegar a más de 1 mm en ciertos flagelos, pero su diámetro externo es de sólo 0,2 μm . El axonema está rodeado por la membrana ciliar externa, que es una dependencia de la membrana plasmática con la que se continúa. To-

dos los componentes del axonema se hallan dentro de la *matriz ciliar* (fig. 5-15).

La figura 5-16 muestra un esquema general del axonema, con la disposición microtubular típica de $9 + 2$. Un plano perpendicular a la línea imaginaria que pasa por ambos tubos centrales intersecta a uno de los pares o dobletes periféricos —que por convención se denomina par número 1— y divide por consiguiente al axonema en dos mitades simétricas (derecha e izquierda). Se admite que el plano de movimiento ciliar es perpendicular a este plano de simetría.

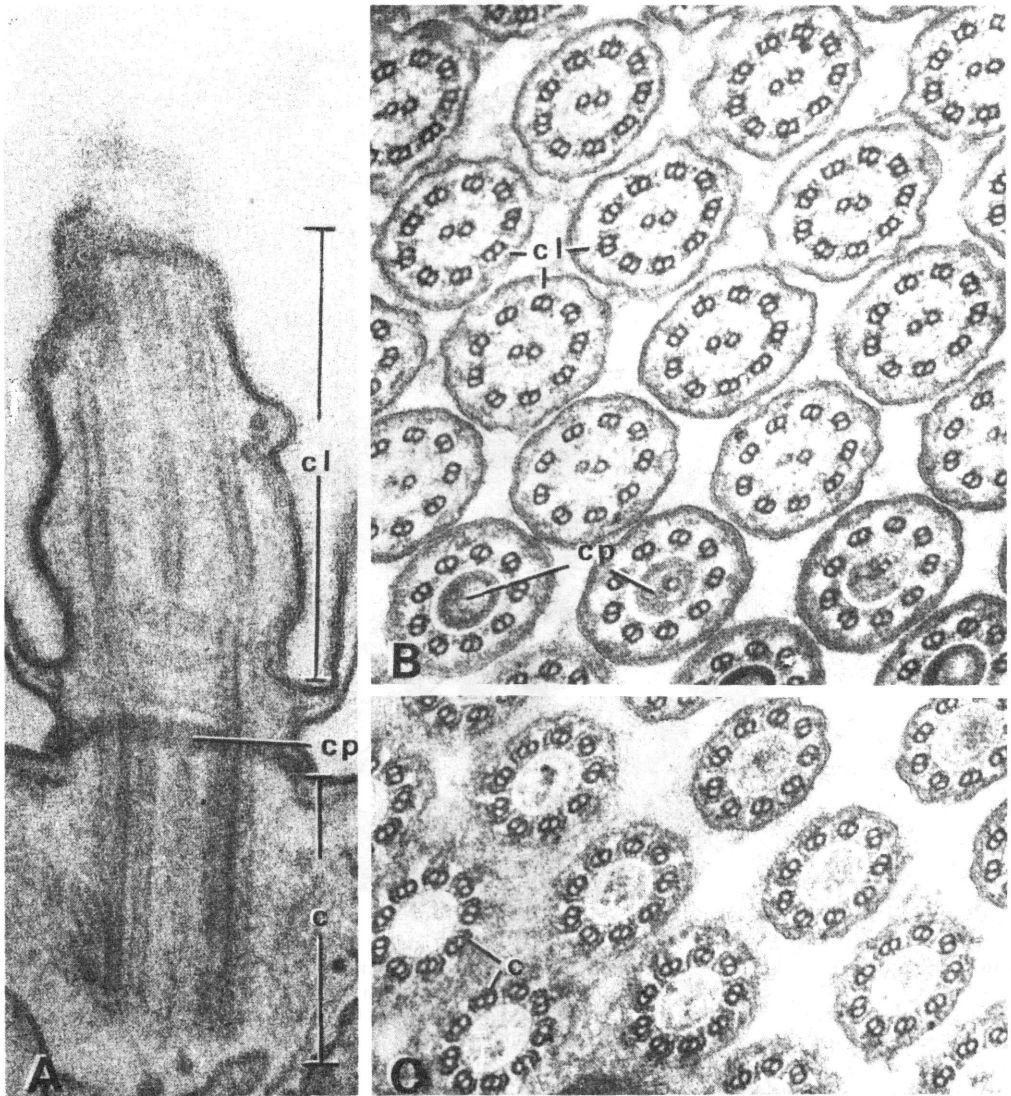


FIG. 5-15. Micrografía electrónica de cilios, en cortes longitudinal y transversales. A. Cilio de *Paramecium aurelia* con el cinetosoma o cuerpo basal (c), la placa ciliar (cp) y el cilio (cl). B y C. Cortes transversales de cilios de *Euplotes eurystome*. En B (cp), el corte muy basal del cilio incluye parte de la placa ciliar. 110.000 $\times$. En C (c), el corte aún más profundo pasa por el cuerpo basal (c) o cinetosoma. Obsérvense la falta de los túbulos centrales y los tripletes periféricos. 70.000 $\times$. (Cortesía de J. André y E. Fauret-Fremiet.)

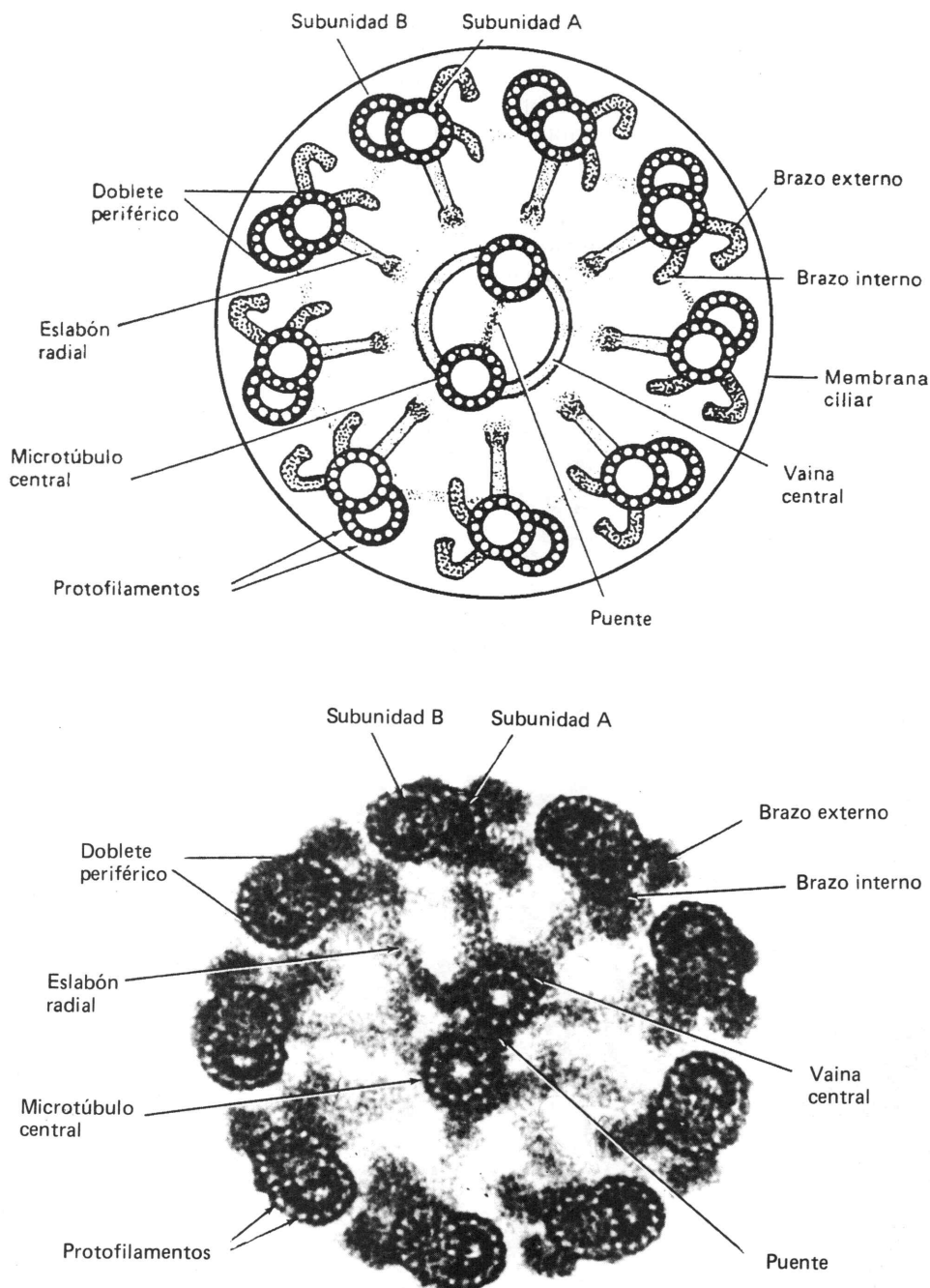


FIG. 5-16. **Arriba.** Esquema de un corte transversal del axonema de un cilio que muestra la estructura microtubular 9+2. La vista es desde la base hacia la punta y los brazos de dineína siguen una dirección en sentido horario. Obsérvense las subunidades de tubulina o protofilamentos. Rara vez pueden verse las uniones de nexina entre los dobletes periféricos. **Abajo.** Micrografía electrónica de un axonema cilial revelado mediante coloración con ácido tánico. (De D. W. Fawcett [1981] *The Cell*. Saunders.)

Los dos microtúbulos de cada par periférico se disponen en forma algo oblicua, de modo que uno de los microtúbulos (denominado subfibra A) se encuentra más próximo al centro del axonema que el otro (subfibra B). El microtúbulo de la subfibra A

es más pequeño pero completo, mientras que el de la subfibra B es más grande pero incompleto, ya que le faltan dos protofilamentos en su pared de la zona adyacente a A. En efecto, mientras que A tiene 13 subunidades de tubulina, B tiene sólo 11.

Los *brazos de dineína* son prolongaciones de la subfibra A que se proyectan periódicamente a todo lo largo del axonema, y en todos los dobletes periféricos están orientados en la misma dirección: en el sentido horario cuando se mira al axonema desde la base hacia la punta ciliar.

El empleo de réplicas de los axonemas obtenidas mediante la técnica del congelamiento rápido con grabado profundo (fig. 3-9) llevó al reconocimiento de detalles más finos de la estructura del brazo de dineína. La dineína ciliar es un complejo de alrededor de 10 cadenas polipeptídicas, que pueden variar en diferentes tipos celulares y que componen una cabeza globular doble o triple, que puede unirse de manera ATP-dependiente con la superficie de la subfibra B del par vecino, y un tallo más delgado unido permanentemente a la subfibra A a la que pertenece.

Las *uniones de nexina* conectan entre sí a los dobletes o pares periféricos de microtúbulos, como se observa en la figura 5-16. La nexina es una proteína de 155 kDa. Se desconoce la función de estas uniones, pero podrían mantener la integridad estructural del axonema durante el movimiento ciliar.

Las *conexiones radiales* son puentes que conectan a la subfibra A de cada par periférico con una vaina proteica que rodea a los microtúbulos centrales. Estos puentes terminan en una cabeza o protuberancia. Se ha sugerido que los puentes se unen perpendicularmente al eje ciliar cuando el cilio es recto, y se separan en las posiciones en que el cilio se dobla, pero su significado funcional es incierto.

5-21. Los cuerpos basales o cinetosomas contienen tripletes de microtúbulos

La homología entre los cuerpos basales o cinetosomas de cilios y flagelos y los centriolos del centrosoma fue sugerida por los clásicos trabajos de Henne-guy y Lenhoseek en 1897. En algunos organismos unicelulares un centriolo puede formar un flagelo, y en determinada fase del ciclo vital el flagelo se pierde y el centriolo interviene en la formación del huso mitótico.

En los organismos superiores, sin embargo, las células ciliadas poseen un par centriolar en el centrosoma, mientras que cada uno de los cilios se origina en uno de los varios centenares de cinetosomas dispuestos por debajo de la membrana plasmática, cada uno de los cuales posee una estructura muy similar a la descrita para los centriolos del centrosoma. Es de hacer notar que, salvo en etapas muy tempranas de la diferenciación de ciertas células (fig. 5-17), los cinetosomas no son estructuras dobles ortogonales como los diplosomas, sino que están constituidos por un solo cilindro.

En la formación del axonema ciliar o flagelar, el centriolo se ubica perpendicularmente a la membrana, con su extremo distal —con la parte [+] de los microtúbulos— orientado hacia la superficie. Este extremo posee un material denso denominado *placa ciliar* o *placa basal*, que lo cierra a modo de tapa. A través de la placa basal se produce el agregado de tubulina a los microtúbulos A y B del cinetosoma, que crecen distalmente a medida que la membrana plasmática se va evaginando para formar la membrana ciliar. El microtúbulo C del cinetosoma no se elonga.

El par microtubular central del axonema surge a partir de la placa ciliar por un mecanismo de inducción desconocido.

Las *raíces ciliares* se originan, en algunas células, en el extremo proximal del cinetosoma o cuerpo basal. La mayor parte de las raicillas son estriadas y presentan bandas transversales regulares que se repiten con un intervalo de 55 a 70 nm. Las fibrillas estriadas están compuestas por microfilamentos paralelos de 3 a 7 nm de diámetro, formados a su vez por subunidades globulares. Estas fibrillas y filamentos podrían cumplir un papel estructural, al servir de fijación a los cinetosomas.

Los *pedículos basales* de los cinetosomas son prolongaciones densas que se orientan perpendicularmente al cuerpo basal. Están constituidos por filamentos que terminan en una barra densa, e imparten al cinetosoma una asimetría estructural que ha sido relacionada con la dirección del movimiento ciliar.

Los *satélites* de los cuerpos basales ciliares son los equivalentes del material pericentriolar del centrosoma y de ellos irradian microtúbulos citoesqueléticos.

5-22. Movimiento ciliar

El movimiento ciliar se analiza fácilmente raspando con una espátula el epitelio faríngeo de la rana o del sapo, y colocando el producto del raspado con una gota de líquido fisiológico entre el portaobjeto y el cubreobjeto. Visto el preparado con el microscopio, en la superficie libre de las células epiteliales se ven los cilios animados de rapidísimos movimientos. Si se observa una hilera de cilios puede apreciarse que la contracción es *metacrónica* en el plano de la dirección del movimiento, vale decir que el movimiento de un cilio se produce un poco antes que el del cilio situado después que él y un poco después que el del cilio situado inmediatamente antes. De este modo, aparecen verdaderas ondas de contracción. En cambio, en la hilera perpendicular a la dirección del movimiento, la contracción es *sincrónica*: todos los cilios se hallan simultáneamente en la misma fase.

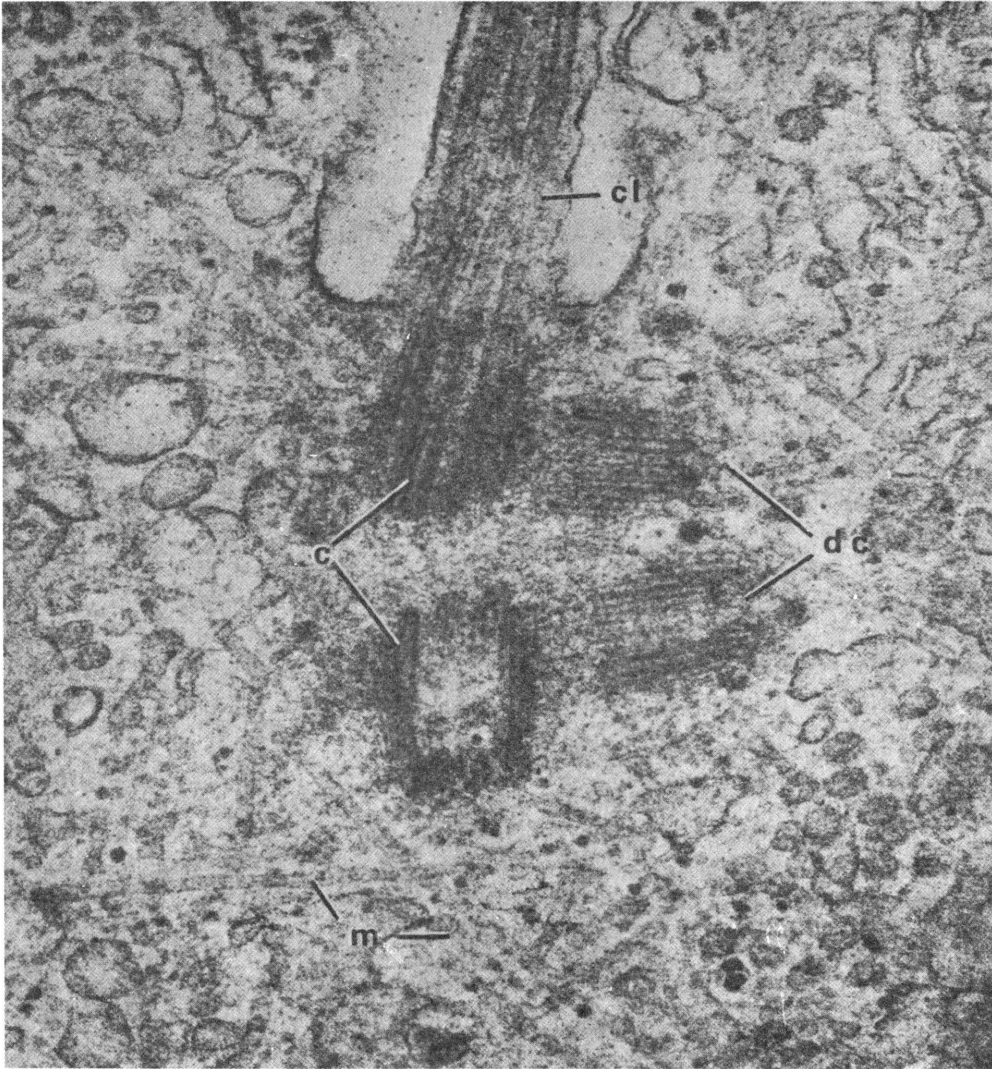


FIG. 5-17. Micrografía electrónica del páncreas de embrión de pollo, en la que se observa la duplicación de los centriolos. c, los dos centriolos; dc, centriolos hijos; cl, cilio; m, microtúbulos. En etapas tempranas de la diferenciación celular es común, como en este caso, que de uno de los centriolos brote un cilio primitivo aun en células que en adulto no serán ciliadas. 50.000X. (Cortesía de J. André.)

El mecanismo no es regulado por el sistema nervioso, dado que persiste después que el epitelio ha sido separado del resto del organismo. Sin embargo, si se efectúa un corte en la hilera de cilios, las ondas de contracción de los dos trozos aislados pierden su coordinación.

La dirección en que se efectúa la contracción ciliar depende también del citoplasma subyacente. Cuando se extirpa un trozo del epitelio de la faringe de rana y se lo implanta con una orientación invertida, el movimiento subsiste pero en dirección contraria a la del resto del epitelio intacto.

Las contracciones de los cilios son generalmente muy rápidas (10 a 17 por segundo en la faringe de la rana). El análisis del movimiento ha sido facilita-

do por el empleo de estroboscopia y de cinematografía ultrarrápida.

El movimiento ciliar puede ser pendular, unciforme, infundibuliforme u ondulante. En el infundibuliforme, el cilio rota y describe una forma cónica o de embudo, y en el ondulante, típico de los flagelos, hay ondas de contracción que parten del lugar de implantación y llegan hasta el extremo libre.

5-23. En el movimiento ciliar, el deslizamiento de dobletes o pares microtubulares es motorizado por la dineína

El proceso clave en el movimiento ciliar o flagelar es el deslizamiento de los dobletes microtubulares,

uno sobre el otro, con unión, deformación y separación de los brazos de dineína, que a la manera de puentes transversales relacionan entre sí a los dobletes vecinos.

Se puede observar fácilmente el desplazamiento de los dobletes porque, como se muestra en el esquema de la figura 5-18, los microtúbulos centrales se extienden hasta la misma punta, mientras que las subfibras B terminan a una distancia de 1 a 2 μm de la punta, y las subfibras A terminan algo más allá que las B. En la mencionada figura, los dobletes 1 y 6 están representados en la posición vertical, así como durante el movimiento efectivo y el retorno. Obsérvese que en el corte transversal de la punta ciliar en la posición de reposo, todos los dobletes periféricos son visibles; en los otros cortes falta la subfibra B de algunos de los dobletes situados en el lado convexo del cilio. Esta es una demostración de que hay deslizamiento entre los dobletes.

Durante el movimiento ciliar, los brazos de dineína adheridos a la subfibra A forman adhesiones intermitentes con la subfibra B del doblete adya-

cente, y se deslizan por la superficie de éste hacia el extremo [-]. De esta manera la dineína impulsa a los dobletes adyacentes hacia la punta ciliar; puesto que todos los microtúbulos ciliares están rígidamente insertados en la placa basal ciliar, el deslizamiento relativo de los dobletes se traduce en el movimiento de torsión lateral característico. Esto se ilustra esquemáticamente en la figura 5-19. En dicha figura están representados dos dobletes adyacentes (N y $N + 1$), junto con la inserción de la dineína de N a la subfibra B de $N + 1$. En la porción (A) del esquema se parte de un estado de adhesión, que se continúa en (B) con la liberación de la dineína. Este proceso es independiente de la hidrólisis del ATP. El paso siguiente de este ciclo sería la reextensión del brazo de dineína (C) y su nueva fijación en ángulo (D), en un nuevo sitio más próximo al extremo [-] de la subfibra B. Este paso aparentemente necesita de la hidrólisis de ATP a ADP + Pi. En el último paso (E), el cambio conformational de la dineína propulsa el deslizamiento de los dobletes entre sí. La acción ATPásica reside en el mismo brazo de dineína.

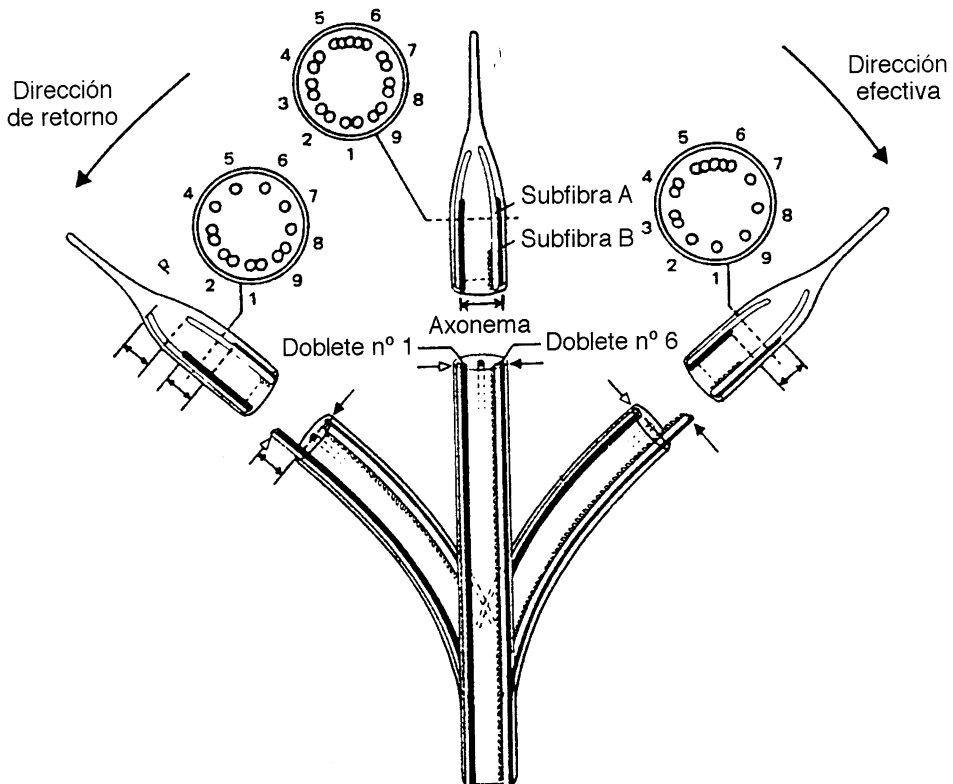


FIG. 5-18. Esquema que representa el mecanismo del deslizamiento de dobletes microtubulares en el movimiento ciliar. En corte longitudinal se muestra la punta de un cilio con los dobletes números 1 y 6. En corte transversal se observan los 9 dobletes de los microtúbulos en posición de reposo, el cilio inclinado en dirección del golpe efectivo (derecha) y del golpe de retorno (izquierda). Obsérvese que entre la subfibra A y la B hay un desplazamiento y que el cilio, en general, experimenta cierto grado de rotación. Es posible reconocer estos dos hechos observando el número de microtúbulos en el corte transversal y la posición de los pares 1 y 6. (Modificado de P. Satir; tomado de D. W. Fawcett [1981] *The Cell*, 2nd ed. Saunders.)

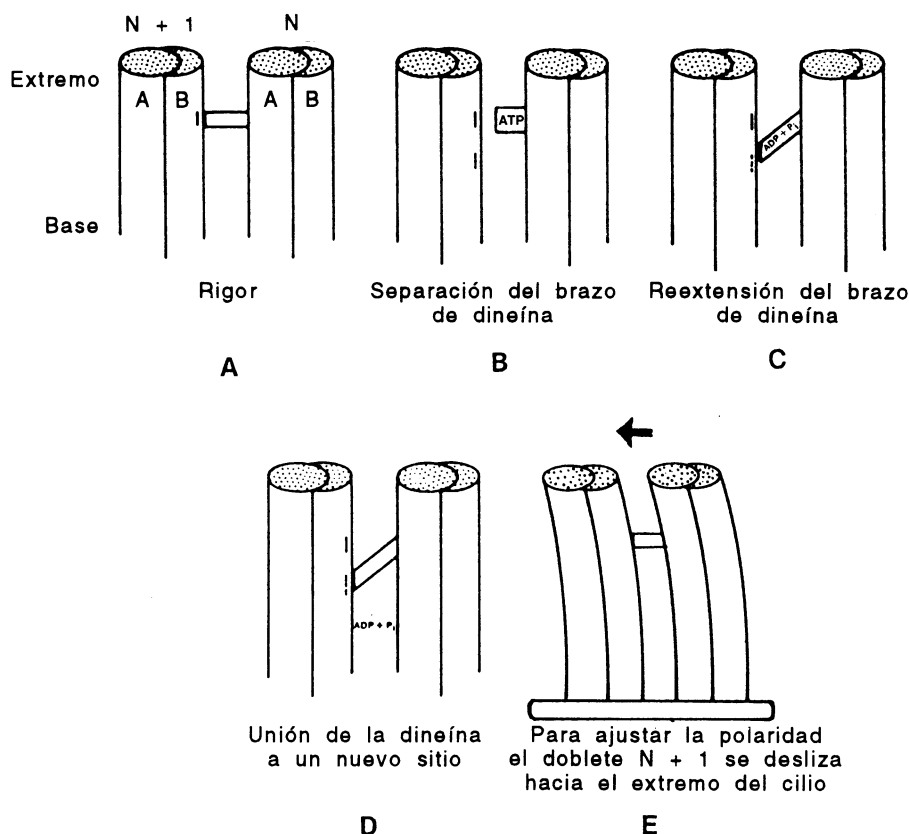


FIG. 5-19. Representación esquemática del ciclo mecanoquímico que interviene en el movimiento ciliar. Véase la explicación en el texto. (Cortesía de P. Satir et al. [1981] *Cell Motility* 1:303, modificado.)

En los flagelos de espermatozoides se ha observado que el movimiento está regulado por Ca^{2+} , AMPc y por quinasas y fosfatasa que parecen actuar sobre ciertas proteínas del axonema.

5-24. Síndrome del cilio inmóvil

El movimiento ciliar puede estar afectado por una serie de deficiencias en la composición proteica del organoide. Los axonemas flagelares de *Chlamydomonas* han sido motivo de estudio de numerosas mutaciones que pueden llevar a la parálisis de la función flagelar. El análisis de varios mutantes ha revelado que con frecuencia el defecto se halla en fosfoproteínas que actúan como reguladoras del movimiento flagelar.

Desde el punto de vista médico, el llamado *síndrome del cilio inmóvil* es de interés especial. En él, los cilios de los epitelios y el flagelo del espermatozoide son inmóviles, y esto lleva a bronquiectasia, sinusitis e infertilidad masculina. En la mayor parte de los casos están afectados los brazos de dineína en grados variables. En el *síndrome de Kar-*

tagener, que se transmite como carácter autosómico recesivo, los brazos de dineína están ausentes o son irregulares, sin actividad ATPásica. A la inmovilidad ciliar y flagelar le acompaña en el 50% de los casos un *situs inversus* total.

El síndrome del cilio inmóvil es, no obstante, una enfermedad genéticamente heterogénea aun cuando desde el punto de vista clínico muestre las mismas características. En efecto, en algunos casos puede haber deficiencia de los rayos radiales, de las fibras de nexina o de algún otro componente ciliar.

5-25. Ciertos receptores sensoriales derivan de cilios

Los estudios sobre la estructura de los receptores sensoriales han demostrado que varios de ellos están relacionados con cilios.

En el caso de los *fotorreceptores* (conos y bastones) de la retina, la corta conexión entre sus segmentos interno y externo es de naturaleza ciliar. Los cortes a través de este "cilio de conexión" revela-

ron la presencia de dupletes microtubulares semejantes a los ciliares (fig. 5-20). En este caso, sin embargo, faltan los microtúbulos centrales, lo que se acepta como una evidencia absoluta de inmovilidad.

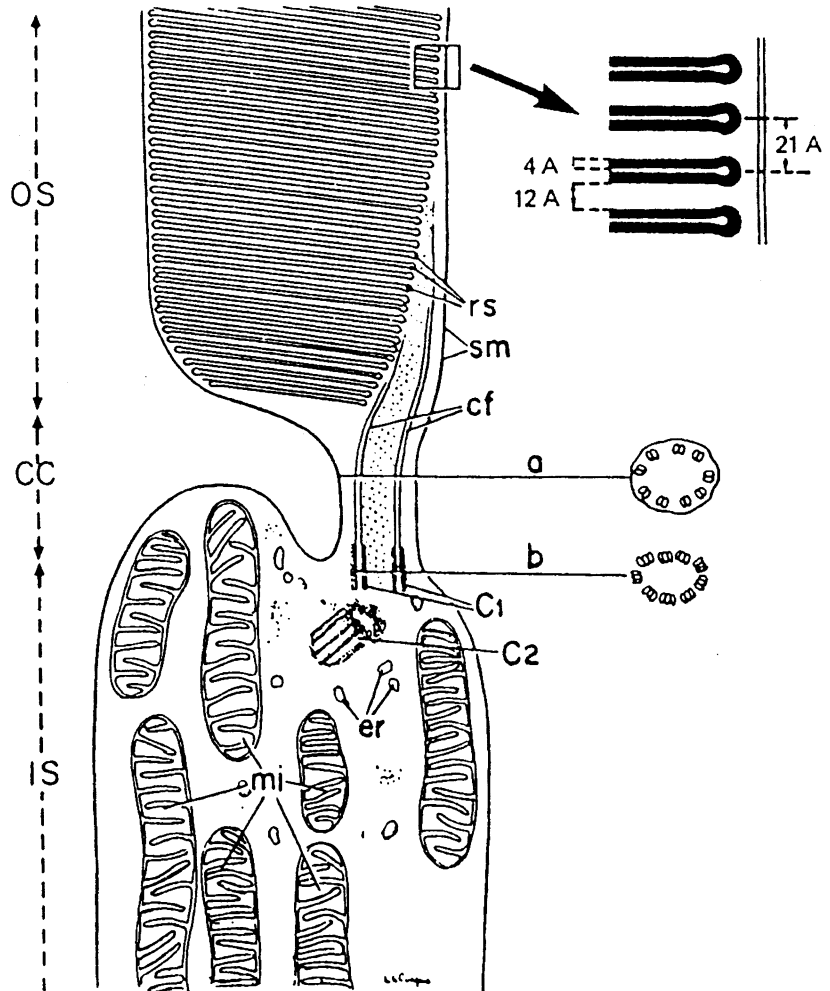
La primera etapa en la diferenciación de un fotorreceptor en el curso de la embriogénesis es la aparición de un *cilio primitivo* a partir del citoplasma del esbozo del segmento interno. Este tipo de cilios posee varias diferencias con respecto a los cilios habituales de las células epiteliales adultas: son algo más largos, únicos, no contienen pares centrales de microtúbulos, son inmóviles y no se originan en un cinetosoma único sino que lo hacen en el par centriolar de la célula, por lo que reciben el nombre de *cilios diplosómicos* o *cilios primitivos*. La mayor parte de las células de diferentes tipos en vías de diferenciación posee un cilio diplosómico, que suele desaparecer cuando la célula alcanza su estado final de diferenciación. Se describieron cilios diplosómicos en células tan variadas como eritroblastos, condroblastos, células endo-

crinas, fibroblastos y muchas otras, en las que la existencia transitoria de tales apéndices no parece tener ningún significado evidente.

En el caso especial de los fotorreceptores, la porción distal del cilio diplosómico (segmento externo) se ensancha por la acumulación en su interior de un gran número de sacos membranosos dispuestos como una pila de monedas; su porción proximal (cilio de conexión) persiste durante toda la vida adulta (fig. 5-21).

Las *células sensoriales del epitelio olfatorio* también poseen estructuras ciliares inmóviles. En cada célula existe un penacho de largas prolongaciones que se extienden por la superficie de la mucosa pituitaria, con una longitud que puede alcanzar los 100 μm . El axonema de cada una de ellas no se extiende más allá de unos pocos micrómetros a partir de los cinetosomas de donde brotan. Luego la estructura ciliar se altera y por lo general persisten sólo once microtúbulos aislados que corren hasta la extremidad del apéndice. Los receptores para las sustancias odorantes son proteínas trans-

FIG. 5-20. Esquema de la ultraestructura de un bastón retiniano de conejo. OS, segmento externo; CC, cilio de conexión; IS, segmento interno; a y b, cortes transversales del cilio primitivo y centriolo, respectivamente; C₁, C₂, centriolo; er, retículo endoplasmático; mi, mitocondria; cf, filamentos ciliares; sm, membrana celular; rs, sacos del bastón. En el recuadro se observa con mayor aumento la estructura de los sacos y las dimensiones de las partes (De E. De Robertis.)



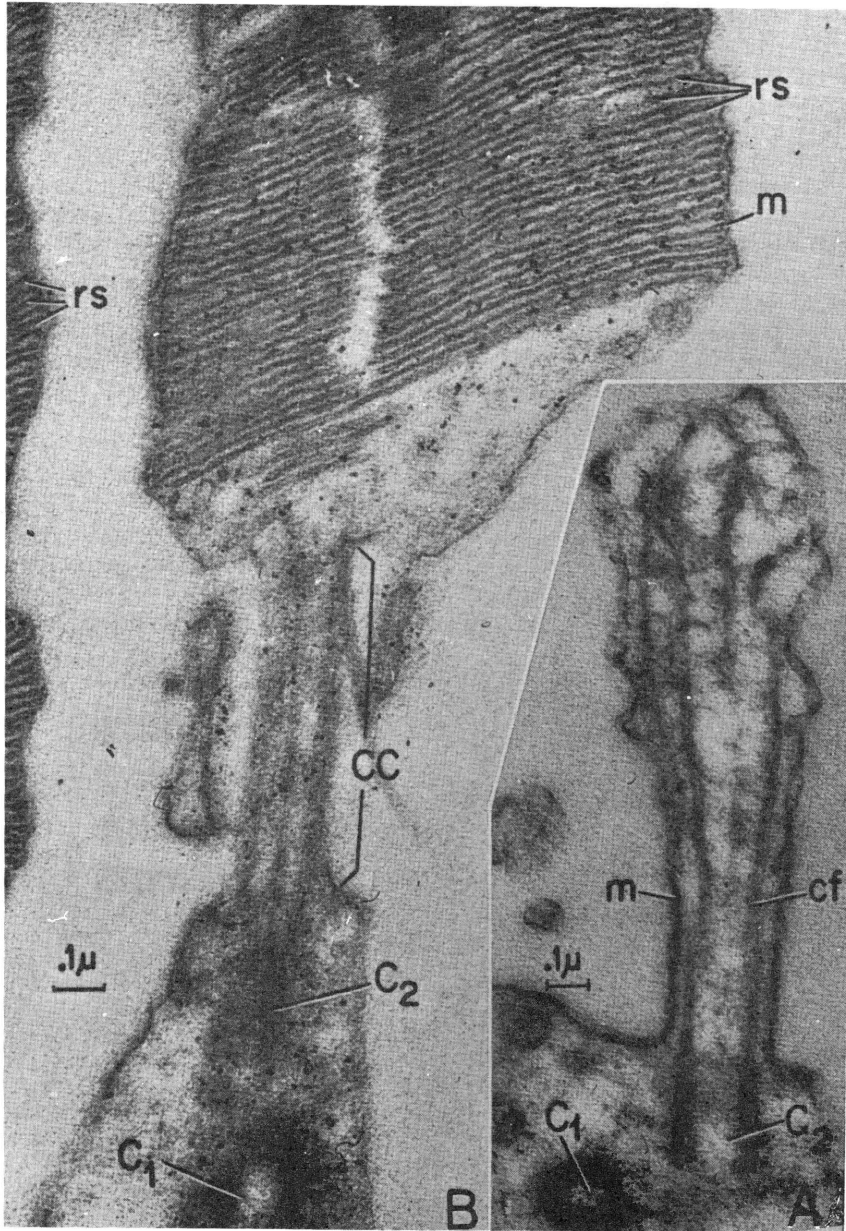


FIG. 5-21. A. Micrografía electrónica de un cilio primitivo en la retina de un ratón de 8 días. m, membrana ciliar; cf, fibrillas ciliares; C1 y C2, centriolos. 72.000 $\times$. B. Fotomicrografía electrónica del bastón de un ratón adulto. Se evidencia el segmento externo con los sacos del bastón (rs) y la membrana externa; el cilio de conexión (CC) y los centriolos basales (C1 y C2). 62.000 $\times$. (De E. De Robertis y A. Lasansky.)

membranosas de la membrana ciliar, que a través de la activación de la adenilato ciclasa (cap. 7) inducen la apertura de canales de sodio dependientes de AMPc y dan lugar a la generación de un potencial propagado.

En el oído interno, las células *neurosensoriales del aparato vestibular* poseen de 40 a 70 largas microvellosidades que funcionan como transductores de aceleración. En estas células existe también una larga prolongación única, móvil, denominada *cinocilio*, que posee una típica estructura ciliar. Este cinocilio se encuentra siempre a un lado del ma-

nojo de microvellosidades sensoriales, lo que da a la célula un eje morfológico de polaridad. Esto es importante porque la respuesta del receptor difiere según la dirección en que se inclinan las microvellosidades. Si las fuerzas gravitacionales o de aceleración que actúan sobre ellas las inclinan hacia el cinocilio, se provoca la apertura de canales iónicos regulados por tensión (cap. 4-7) que originan la despolarización de la membrana con liberación del neurotransmisor. Si las microvellosidades se desplazan hacia el lado contrario al del cinocilio, la membrana se hiperpolariza.

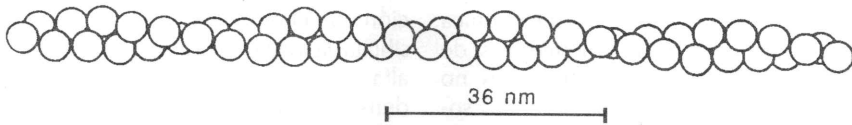


FIG. 5-22. Esquema de la disposición de la actina G para constituir la actina F o microfilamento.

MICROFILAMENTOS

La actina es la proteína más abundante en las células de los mamíferos. Suele representar alrededor del 3% del total proteico celular. En algunos casos, como en células musculares o neuronas en desarrollo, llega hasta el 20%. Se halla en la célula en estado de equilibrio entre sus dos formas: en su mayor parte está como *actina G monomérica*, de configuración globular, con un peso molecular de 42 kDa, que puede convertirse rápidamente en *actina F*, un polímero helicoidal doble, filamentososo, de subunidades de actina G (fig. 5-22).

Estos filamentos de actina F, con un diámetro de 6 a 8 nm, son estructuras citoesqueléticas más delgadas que los microtúbulos y que los filamentos intermedios, por lo que reciben el nombre de *microfilamentos*. Pueden poseer una longitud de varios micrómetros.

Las mamíferos poseen por lo menos seis isoformas de actina, codificadas por genes independientes. Mediante métodos inmunohistoquímicos se

puede detectar una actina específica del músculo liso, otra del músculo estriado y varios tipos de actina no muscular.

Porter describió la llamada *trama microtrabecular* (TMT) utilizando el mayor poder de penetración de la microscopia electrónica de *alto voltaje*, que le permitió obtener pares estereoscópicos de microfotografías en prolongaciones aplanadas de la periferia de células en cultivo.

Como se observa en la figura 5-23, justo por debajo de la membrana hay estructuras microfilamentosas interconectadas, de 4 a 6 nm, que guardan continuidad con otras similares que atraviesan el citosol. Los canales o espacios entre los elementos de esta trama microtrabecular miden de 50 a 100 nm, y en la célula viva permiten la rápida difusión de líquidos y metabolitos por todo el citosol.

Esta estructura microtrabecular se halla en contacto con la membrana plasmática, con los orgánulos del sistema de endomembranas, con polirribosomas y con los microtúbulos y filamentos intermedios que atraviesan sus intersticios.

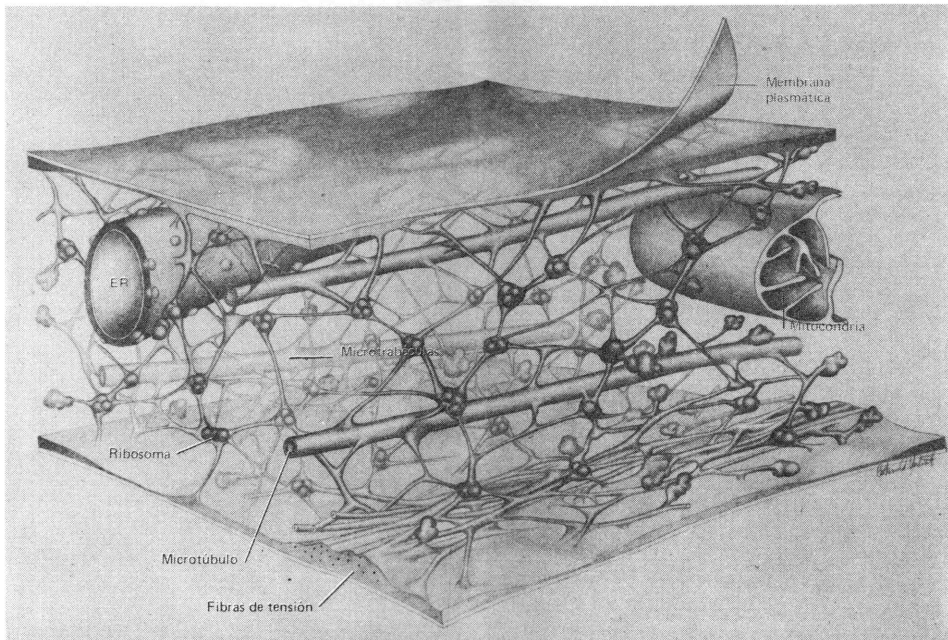


FIG. 5-23. Modelo de la estructura del citoesqueleto de una célula que muestra los diversos componentes contenidos en la matriz citoplasmática. Debajo de la membrana plasmática existen haces de microfilamentos de actina que forman una fibra de tensión. Un enrejado microtrabecular ocupa el citosol y está en contacto con el retículo endoplasmático, los microtúbulos y los ribosomas. 90.000X. (Cortesía de K. R. Porter.)

Mediante técnicas de microscopía electrónica que incluyen la remoción de las membranas de células en cultivo por medio de detergentes no iónicos (triton) y la extracción de las proteínas solubles seguida por una rápida congelación en helio líquido, desecado profundo y sombreado rotatorio, ha sido posible visualizar imágenes de un retículo microtrabecular comparable al descrito por Porter con el microscopio de alto voltaje. La inmunomarcación de actina muestra que el anticuerpo se une tanto a los microfilamentos como a las estructuras más finas del retículo microtrabecular, lo cual sugiere que ambas estructuras estarían constituidas por actina. Pese a todo, algunos autores consideran a la TMT de Porter como un artificio de técnica.

5-26. *Los haces de microfilamentos se pueden detectar inmunohistoquímicamente*

La amplia distribución citoplasmática de la actina permite su fácil identificación en la mayoría de los tipos celulares con métodos inmunohistoquímicos (cap. 3-23). La presencia de la proteína soluble y la disposición de los microfilamentos al azar o formando redes son responsables de una tinción por lo general homogénea de los citoplasmas. Sin embargo, la graduación de la sensibilidad de la reac-

ción con el empleo de colorantes fluorescentes posibilita la visualización preferencial de los sitios de alta concentración, en particular de los manojos densos de microfilamentos paralelos que forman parte del citoesqueleto de algunos tipos celulares (fig. 5-24). El microscopio confocal láser brinda imágenes bastante bien definidas de estas estructuras.

En las células musculares, los filamentos de actina forman estructuras paralelas que alcanzan su mayor grado de ordenamiento en el *sarcómero* del músculo estriado, que analizaremos más adelante en este capítulo.

En células no musculares cultivadas, la actina aparece en forma de fibrillas rectas, a menudo paralelas, dispuestas principalmente junto a la membrana plasmática, en especial en las zonas en contacto con un sostén sólido denominadas *contactos focales*. Estos manojos de microfilamentos de las células en cultivo se denominaron *fibras de tensión*. Pese a que su apariencia rígida podría sugerir que son elementos citoesqueléticos estables, veremos más adelante que son parte de un sistema dinámico relacionado con la locomoción celular, capaz de reorganizarse rápidamente.

Una observación curiosa es que, en una célula cultivada en proceso de aplanamiento, parte de los filamentos de actina puede adoptar la forma de

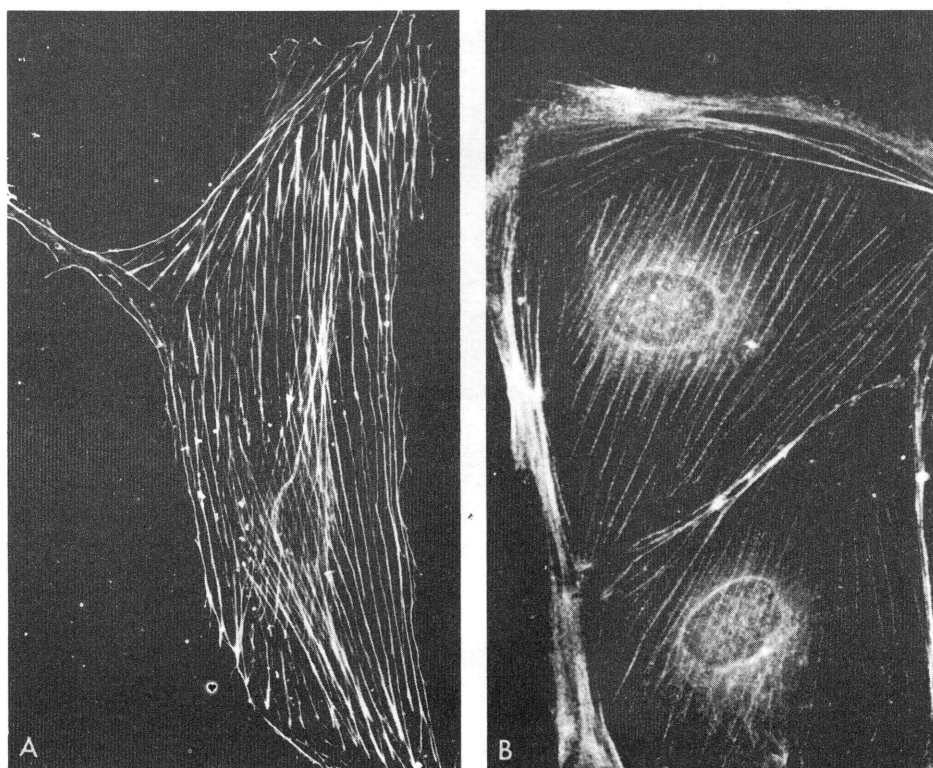


FIG. 5-24. A. Célula mamaria de rata, cultivada y coloreada con anticuerpo antiactina. (Cortesía de K. Weber [1976].) B. Célula semejante coloreada con antimiosina. 600 $\times$. (Cortesía de K. Weber y V. Groeshel-Stewart [1974].)

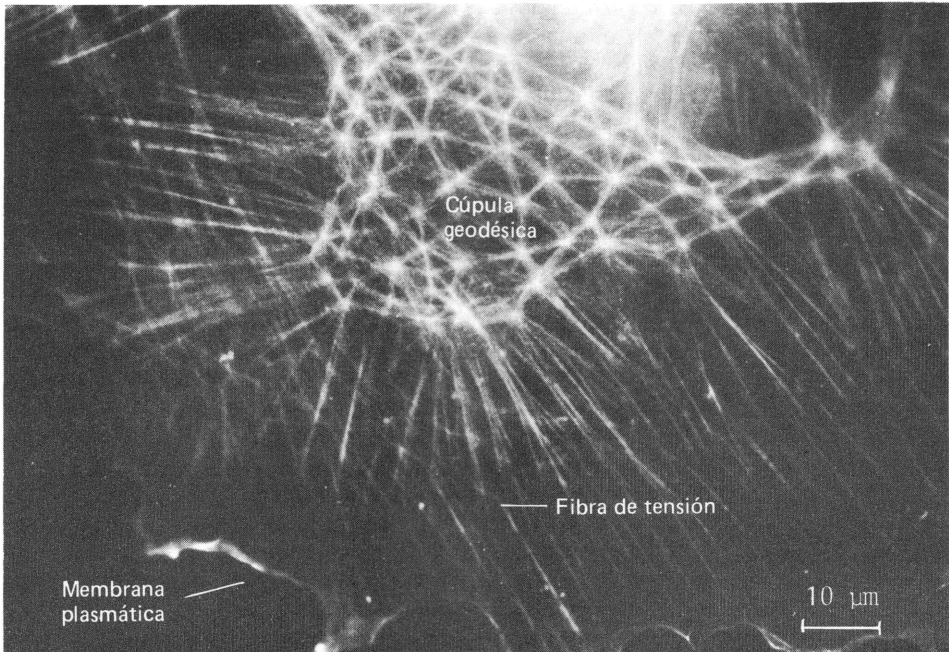


FIG. 5-25. Disposición en domo geodésico de los filamentos de actina alrededor del núcleo de un fibroblasto cultivado que se está extendiendo y aplanando. La actina está coloreada con un anticuerpo antiactina fluorescente. Obsérvese que en la periferia de la célula los filamentos tienen una disposición radial recta. (Cortesía de E. Lazarides.)

una red regular que rodea al núcleo celular, denominada *cúpula geodésica* o *domo geodésico* (fig. 5-25) por su semejanza con las estructuras homónimas diseñadas por el arquitecto Buckminster Fuller. Se observa que los haces de filamentos de actina que irradian de esta cúpula se extienden hacia la periferia, formando lamelipodios y filopodios (que se considerarán más adelante). Los domos geodésicos celulares son estructuras transitorias que se arman y desarman en relación con los cambios morfológicos durante el movimiento.

En las células que poseen microvellosidades bien estructuradas, como los enterocitos o las sensoriales del oído interno, los filamentos de actina están muy bien ordenados y tienen una polarización regular dentro de cada microvellosidad (fig. 5-26). El sarcómero muscular también presenta una organización muy regular.

5-27. Al igual que los microtúbulos, los microfilamentos son estructuras polarizadas

Soluciones purificadas de actina, en presencia de ATP, Mg^{2+} y K^{+} , tienden espontáneamente a formar filamentos. En estas condiciones, una vez formado el microfilamento (nucleación), éste crece diez veces más rápido en uno de sus extremos que en el otro (elongación). El extremo de crecimiento rápido se denomina *extremo más* [+], mientras que el de crecimiento lento es el *extremo menos* [-].

Como en el caso de los microtúbulos, el crecimiento de los microfilamentos depende de la alta afinidad que poseen para unirse entre sí (en forma

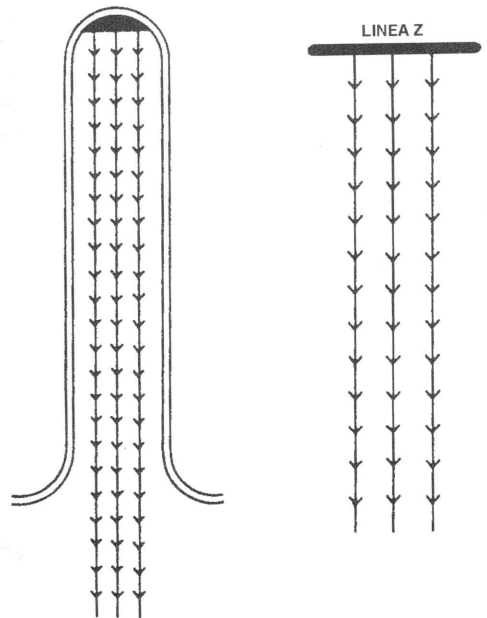


FIG. 5-26. Dibujo comparativo de la polaridad de los filamentos de actina en la microvellosidad y en el músculo esquelético. En relación con la membrana plasmática y con la línea Z terminan los extremos [+] o barbados. (De L. G. Tilney [1975] J. Cell Biol. 67:738.)

no covalente y reversible) los monómeros unidos a su vez a un nucleótido trifosfato (en este caso el ATP). La hidrólisis posterior a ADP del ATP unido a la actina del filamento da como resultado un cambio conformacional de ésta que posibilita la posterior despolimerización de la actina F. Cabe notar, sin embargo, que el fenómeno de inestabilidad dinámica observado en los microtúbulos es apenas perceptible en los microfilamentos. En ciertas condiciones, en éstos es característico un mecanismo que ha sido comparado con el de una cinta transportadora, en el cual los monómeros de actina son agregados continuamente al extremo [+], mientras que se pierden con igual velocidad por el extremo [-] sin que varíe la longitud del filamento.

Si a preparaciones con filamentos de actina se agregan fragmentos S₁ o HMM de miosina, éstos se unen a la actina con una orientación definida y aparecen en las microfotografías electrónicas como una sucesión de flechas que apuntan todas hacia el extremo [-] o *en punta* del filamento; el extremo [+] es llamado *extremo barbado*.

5-28. Existen drogas que estabilizan o desestabilizan a los microfilamentos

Al igual que la colchicina y el taxol sobre los microtúbulos, ciertas toxinas aisladas de hongos venenosos interfieren en la polimerización-despolimerización de los microfilamentos. Las citocalasinas se unen al extremo [+] del microfilamento y de esta manera impiden la polimerización de la actina e interfieren en varios procesos celulares, en particular en la locomoción, la contracción muscular, la citocinesis o algunos acontecimientos relacionados

con la endocitosis. Las faloidinas, por su parte, se unen a lo largo de los microfilamentos e imposibilitan su despolimerización.

5-29. Proteínas fijadoras de actina

Los estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos revelaron la existencia, en la mayoría de las células de los vertebrados, de diversas moléculas reguladoras o estructurales que genéricamente se denominan *proteínas fijadoras de actina*. Aunque este grupo de proteínas es muy complejo, se las puede ordenar en varias clases funcionales (fig. 5-27):

- a) las que tienden a secuestrar a la actina en su forma monomérica (*timosina*);
- b) las que favorecen las uniones transversales entre filamentos y los estabilizan en manojos paralelos (α -*actinina*, *fimbrina* y *villina*);
- c) las que fragmentan a los filamentos largos de actina (*gelsolina*);
- d) las que forman enlaces en sitios de entrecruzamiento de filamentos y estabilizan redes tridimensionales gelificadas (*filamina*);
- e) las que mantienen rectilíneos a los filamentos (*tropomiosina*);
- f) las de adhesión a la membrana (*espectrina*, 4.1, *ancrina*, *cateninas*, etc.);
- g) las motoras (*miosina I* y *miosina II*).

La tabla 5-1 resume algunas de las propiedades de estas proteínas.

La abundancia de la actina en todas las células de los mamíferos y su capacidad de polimerizar espontáneamente en concentraciones relativamente bajas la hacen especialmente peligrosa en caso de lesión celular masiva, como necrosis hepática fulminante o fallas de perfusión asociadas a falla

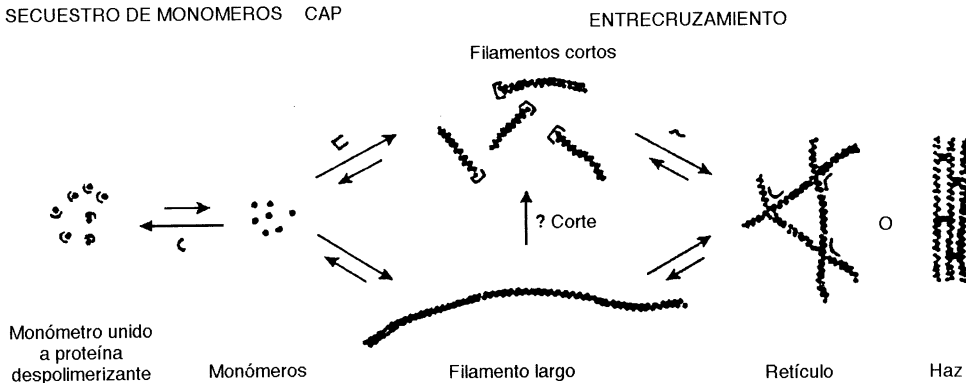


FIG. 5-27. Esquema que representa la posible acción de las proteínas fijadoras de la actina. La clase I establece uniones transversales con los filamentos para formar retículos y haces. La clase II forma una cubierta (cap) en un extremo del filamento y puede cortar filamentos preformados. La clase III inhibe la polimerización uniéndose a los monómeros de actina. (Cortesía de Susan Craig.)

TABLA 5-1. Clasificación de algunas proteínas fijadoras de actina

<i>Proteína</i>	<i>Masa (kDa)</i>	<i>Localización</i>
I. Proteínas que forman enlaces entre microfilamentos		
A. Gelificantes		
Filamina	2 × 250	Músculo liso, fibroblasto, múltiples células
Espectrina	4 × 260-265	Esqueleto de membrana en múltiples células
B. Estabilizadoras de haces		
Vinculina	130	Músculo, contactos focales, bandas de adhesión
Fimbrina	68	Microvellosidades de casi todas las células no musculares
α-Actinina	2 × 100	Músculo, contactos focales, bandas de adhesión
Villina	95	Microvellosidades
Tropomiosina	35	Varias isoformas en diferentes células Se une lateralmente a un solo filamento
II. Proteínas que seccionan y forman capuchón		
β-Actinina	43	Músculo,seudópodos
Gelsolina	90	Células de mamíferos
Fragmina/severina	42	<i>Physarum</i> , <i>Dictyostelium</i>
Proteína cap		<i>Acanthamoeba</i>
III. Proteínas antipolimerizantes		
Timosina β4	5	Neutrófilos
Profilina	12-15	Isoformas en la mayor parte de las células
IV. Proteínas motoras		
Miosina I	110-140	Múltiples isoformas en diferentes células,seudópodos de <i>Acanthamoeba</i> y <i>Dictyostelium</i> , microvellosidades
Miosina II	200	Músculo, citocinesis, fibras de tensión, cono de crecimiento neuronal

Datos de Craig y Pollard, 1982; Weeds, 1982; Luna y Hitt, 1992.

respiratoria aguda, por ejemplo. En efecto, cuando la actina es liberada de las células muertas hacia los espacios extracelulares, exhibe una fuerte tendencia a polimerizar espontáneamente en el fluido extracelular y dentro de los vasos sanguíneos, donde la presencia de filamentos de actina puede ser fatal. En el plasma sanguíneo existen normalmente cantidades elevadas de *gelsolina plasmática* —una isoforma de la gelsolina citoplasmática— y de *proteína Gc*. Ambas tienden a mantener a la actina en su forma monomérica, eliminable de la circulación.

5-30. Las funciones de los filamentos de actina son múltiples

Los microfilamentos son esenciales para posibilitar los movimientos celulares, para determinar la dinámica de la forma celular, para la adhesividad entre células o entre células y matrices, y en múltiples niveles para la organización de la superficie celular.

Función mecánica. Como ya analizamos en el caso de los componentes microtubulares del citoesqueleto, la capacidad de las redes microfilamentosas para resistir tensiones es de por sí muy limitada. Esta función estructural del esqueleto citoplasmático la cumplen específicamente, como veremos más adelante, los filamentos intermedios.

Sin embargo, el papel estructural de la actina es de fundamental importancia para la constitución del *esqueleto de membrana* (cap. 4-3) y para el mantenimiento de estructuras rígidas permanentes relacionadas con las membranas, como las microvellosidades de los enterocitos (chapa estriada) o de las células sensoriales del oído (estereocilios).

Las *transiciones reversibles sol-gel* que tienen lugar en la corteza celular (ectoplasma) otorgan una rigidez variable a la superficie citoplasmática. Se deben a la rápida reorganización de los filamentos de actina. Cuando éstos se despolimerizan, se orientan al azar o forman haces paralelos, las propiedades físicas del citoplasma son las de un coloi-

de líquido viscoso (sol). Cuando los microfilamentos forman redes tridimensionales densas, estabilizadas en los puntos de entrecruzamiento por la *filamina*, el agua queda atrapada en las mallas de la red esponjosa y el coloide (gel) presenta las propiedades de algunos sólidos, como por ejemplo resistencia elástica a la deformación.

Estos cambios en el entrelazamiento de los microfilamentos del ectoplasma suelen ser iniciados por la unión de ciertas moléculas (factores de crecimiento, sustancias quimiotácticas y otras) a receptores de la membrana plasmática que desencadenan una serie de reacciones moleculares (transducción de la señal [cap. 7]). Sin embargo, a veces otros estímulos, como el frío, pueden desencadenar de por sí este tipo de cambios. Por ejemplo, si se enfrían las plaquetas sanguíneas, cambian irreversiblemente de forma y adquieren un aspecto estrellado que las incapacita funcionalmente. Esto representa un problema práctico para los bancos de sangre, ya que las plaquetas obtenidas para transfusión no pueden ser refrigeradas.

Desplazamiento celular. Cuando son estimulados en forma apropiada (por sustancias quimiotácticas o por factores de crecimiento, por ejemplo), muchos tipos celulares poseen la capacidad de desplazarse cuando están adheridos a un sustrato sólido, tal como las matrices extracelulares o las paredes de un recipiente de cultivo de tejidos. La migración celular en el curso de la embriogénesis, el movimiento de los leucocitos hacia un foco inflamatorio, la diseminación de las células cancerosas o los desplazamientos de los fibroblastos hacia una herida en reparación son algunos pocos ejemplos de la importancia del movimiento celular.

Los movimientos de traslación de las células animales consisten en un lento arrastre, con transformaciones de su forma externa que dependen de múltiples cambios en el tipo de asociación de la actina y moléculas relacionadas. La velocidad del desplazamiento es variable: los fibroblastos estimulados en el tejido conectivo no superan en general 0,5 μm por hora, mientras que los leucocitos humanos atraídos por sustancias quimiotácticas se mueven hasta 30 μm por minuto.

Los movimientos de desplazamiento de las células dependen de cambios activos de la configuración de su superficie, que implican la extensión, adhesión y tracción coordinadas de la zona periférica del citoplasma, que parecen depender principalmente de las propiedades de una delgada zona citoplasmática por debajo de la membrana plasmática, denominada *ectoplasma*. Esta zona cortical aparece homogénea y desprovista de gránulos u organoides, a diferencia del citoplasma central, denominado *endoplasma*, que forma la mayor parte de la célula.

No se conocen con certeza los fenómenos moleculares que ocurren en el citoplasma de la célula en movimiento, aunque se sabe que los cambios en la disposición, polimerización y fragmentación de los filamentos de actina tienen un papel fundamental.

Una forma especial de locomoción denominada *ameboidismo* es característica de las amebas y de muchas células libres. Algunas amebas son predominantemente monopódicas —poseen un seudópodo—, pero otras pueden ser polipódicas de modo temporario o permanente. La forma de los seudópodos varía desde un lobópodo macizo, casi cilíndrico, hasta delgados filopodios filamentosos o ramificados. A veces estas finas prolongaciones se anastomosan —reticulopodios—, como ocurre en los foraminíferos.

Los movimientos celulares se aprecian mejor en fotografías tomadas a intervalos periódicos (microcinematografía). En el caso de *fibroblastos en cultivo de tejidos*, se observa que después de algunas horas de cultivo las células adquieren una forma poligonal, con extensiones laminares del citoplasma frontal (hacia el lado de avance) denominadas *lamelipodios*. Estos lamelipodios constituyen el principal proceso de locomoción de las células ameboides y se han estudiado muy bien mediante el microscopio electrónico de barrido. En la figura 5-28 se puede ver una célula en cultivo de tejidos que envía lamelipodios a la superficie del vidrio sobre el que se está moviendo. También se observa en la figura que la formación de lamelipodios es inhibida en forma reversible por la droga *citocalasina B*, que interfiere en la formación de filamentos de actina.

Además de lamelipodios, la célula envía finas prolongaciones filiformes denominadas *filopodios* (o *micropúas*), que aparentemente tienen una función de exploración, para reconocer el área en la cual se extiende la célula. Si el área es satisfactoria, sus extremos se adhieren a elementos fijos de la matriz extracelular. De inmediato los lamelipodios y las micropúas se contraen —en su interior poseen manojos de microfilamentos de actina—, y las células se desplazan hacia adelante. A continuación, se desprenden de la matriz las micropúas recientemente contraídas y se adhieren otras nuevas, pero a elementos de la matriz situados más adelante.

El avance de las células resulta de la reiteración de estos episodios de *proyección-adhesión-retracción*. En estos tres procesos, como veremos a continuación, está involucrada la actina.

El mecanismo molecular para la *proyección* de lamelipodios y filopodios parece ser la polimerización cortical de *actina* en manojos paralelos al eje de la proyección citoplasmática. En algunos casos particulares, como el de la ameba gigante, se describe la formación de seudópodos por cambios re-

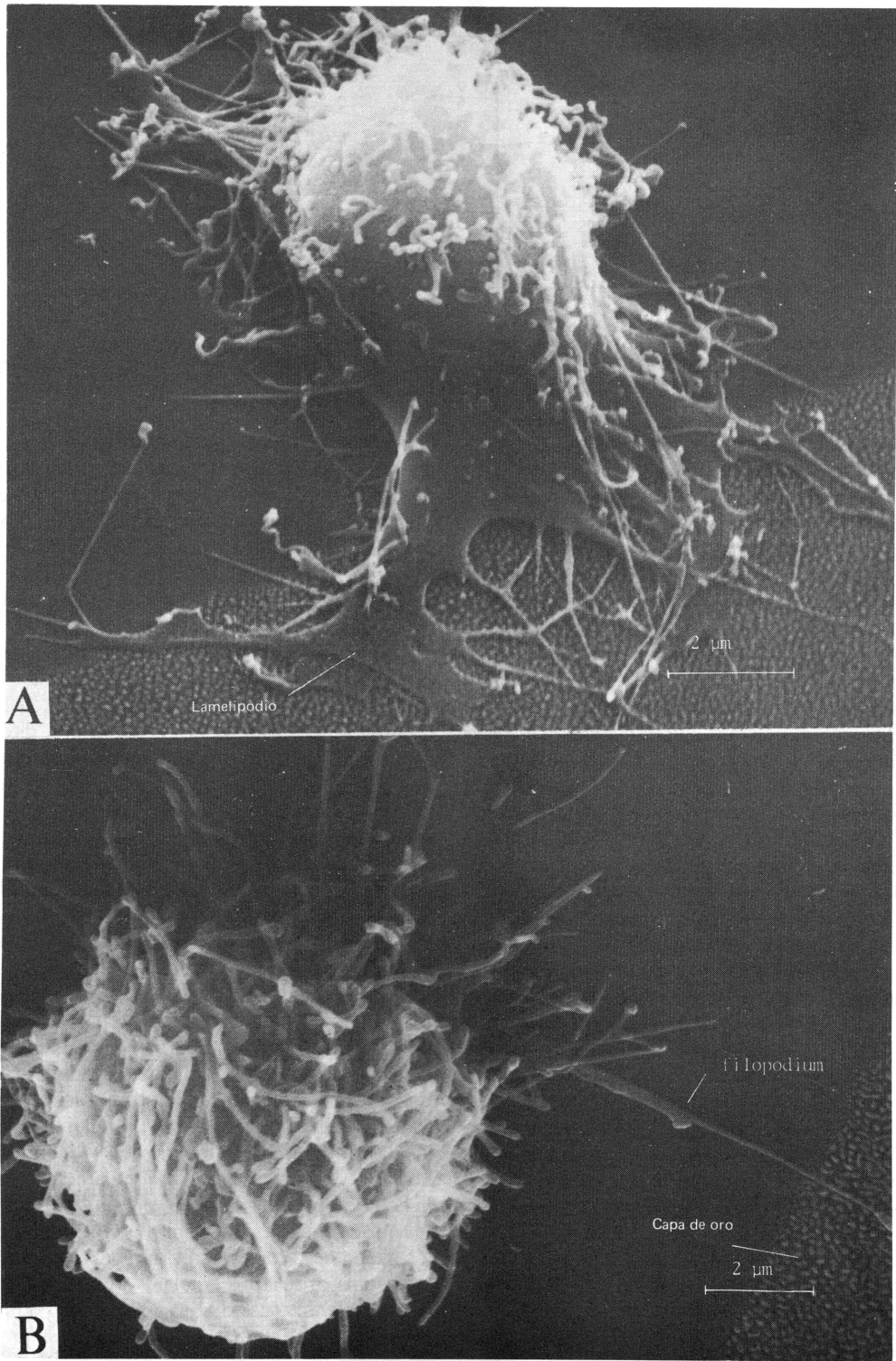


FIG. 5-28. **A.** Célula 3T3 cultivada en placa en un medio normal. La célula ha hecho sus adherencias cerca del borde entre el vidrio y una región cubierta por partículas de oro. Obsérvese que un lamelipodio plegado se extiende hacia el área recubierta con oro. Se ven pequeñas burbujas en la superficie dorsal. **B.** Una célula parecida pero con el agregado de citocalasina B. La célula está cubierta por microvellosidades y se ven algunos largos filopodios, pero no se han formado lamelipodios. Este proceso es reversible si se saca la citocalasina B. Micrografía electrónica de barrido. Las barras indican 2 nm. (Cortesía de G. Albrecht-Bühler.)

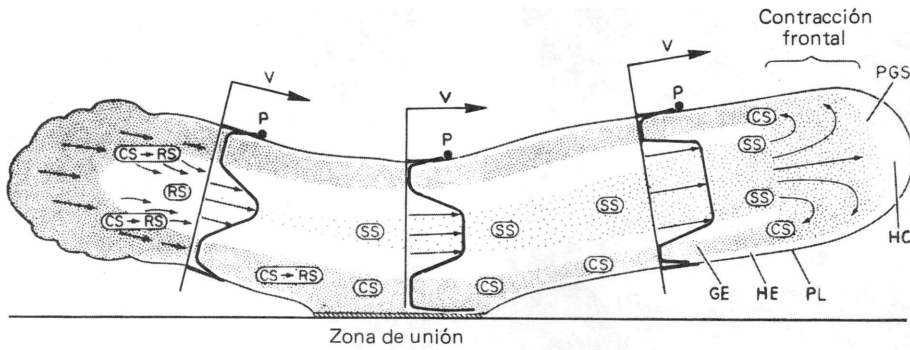


FIG. 5-29. Modelo de contracción frontal para el movimiento ameboide. SS, Regiones estabilizadas; CS y RS, regiones contraídas y relajadas; V, perfil de velocidad; HC, capuchón hialino; PGS, capa de plasmagel; HE, ectoplasma hialino; GE, ectoplasma granular; PL, plasmalema. (De D. L. Taylor et al. [1973].)

versibles sol-gel de la capa ectoplasmática con protrusión de la membrana plasmática por un aumento de la presión hidrostática en el sol endoplasmático transmitida a la superficie a través de la corteza ectoplasmática debilitada por la solación (fig. 5-29).

Los mecanismos responsables de la *retracción* de las prolongaciones tampoco son conocidos, aunque se supone un mecanismo de deslizamiento similar al muscular, en el que intervienen la *actina* y la *miosina II*.

La *adhesión* de la célula ameboide al soporte sólido no se cumple en toda su superficie, sino únicamente en un número limitado de sitios denominados *placas de adhesión* (fig. 5-30), que son aquellos en los que manojos de filamentos corticales de *actina* ("fibras de tensión") se unen, a través de proteínas intermediarias, a los dominios citosólicos de glucoproteínas transmembranosas denominadas *integrinas*, que actúan como moléculas de adhesión a las matrices extracelulares. El rápido ensamblado y desensamblado característico de los microfilamentos asegura que estos contactos focales se formen y rompan continuamente a medida que la célula se desplace. En el capítulo 6 se tratarán en detalle las características de la adhesión celular.

Contracción en células no musculares. Muchos tipos de células no musculares poseen la propiedad de generar tensiones o de producir movimientos de deformación o acortamiento citoplasmáticos. Algunos de esos mecanismos se utilizan, como vimos, en la locomoción celular. En otros casos el resultado no se relaciona con la motilidad, como en la generación de tensiones sin deformación en las láminas epiteliales a nivel de los desmosomas en banda, o la contracción citoplasmática en la citocinesis de las células animales (fig. 5-31).

La mayor parte de nuestros conocimientos acerca de la maquinaria molecular que interviene en la contracción celular derivaron originalmente de los estudios del músculo esquelético, que tiene una estructura sarcomérica muy elaborada y regular.

Durante mucho tiempo fue un enigma el movimiento en las células no musculares, hasta que se demostró que contienen las mismas proteínas contráctiles (*actina* y *miosina*) que el músculo. Esto sugiere que la *contracción no sarcomérica* podría ser semejante a la del músculo, y que la generación de fuerza sería causada, lo mismo que en éste, por un mecanismo de deslizamiento.

La *miosina* existe en dos formas principales: la *miosina II* (que es la más abundante) y la *miosina I* (más escasa y pequeña). Cada una de ellas comprende varios isotipos codificados por diferentes genes. Todas las miosinas son proteínas motoras que poseen una cabeza globular capaz de unirse a los filamentos de *actina*, sobre los que se desplaza siempre hacia el extremo [+], con hidrólisis de ATP. La *miosina* puede provocar el deslizamiento entre sí de filamentos paralelos de *actina* orientados con su polaridad opuesta, motorizando el acortamiento de manojos microfilamentosos, que es la base tanto de la contracción muscular como de la no muscular (véase más adelante).

Transporte de materiales: La parte variable de los distintos isotipos es el dominio no globular, que determina la diferente función que puede desempeñar cada molécula en la fisiología celular. De acuerdo con el tipo de la cola no globular, las moléculas de *miosina I* pueden mover diferentes partículas o vesículas sobre el microfilamento, como lo hace la *quinesina* sobre los microtúbulos.

Morfogénesis. Como analizaremos en el capítulo siguiente, la formación de microvellosidades estables en varios tipos celulares depende del crecimiento de haces de microfilamentos orientados perpendicularmente a la superficie celular, como en el caso de los enterocitos. La estabilidad ulterior de las microvellosidades así originadas depende de las interacciones entre los microfilamentos en el eje de la prolongación, las proteínas fijadoras de *actina*, la membrana plasmática y el citoesqueleto superficial de la célula.

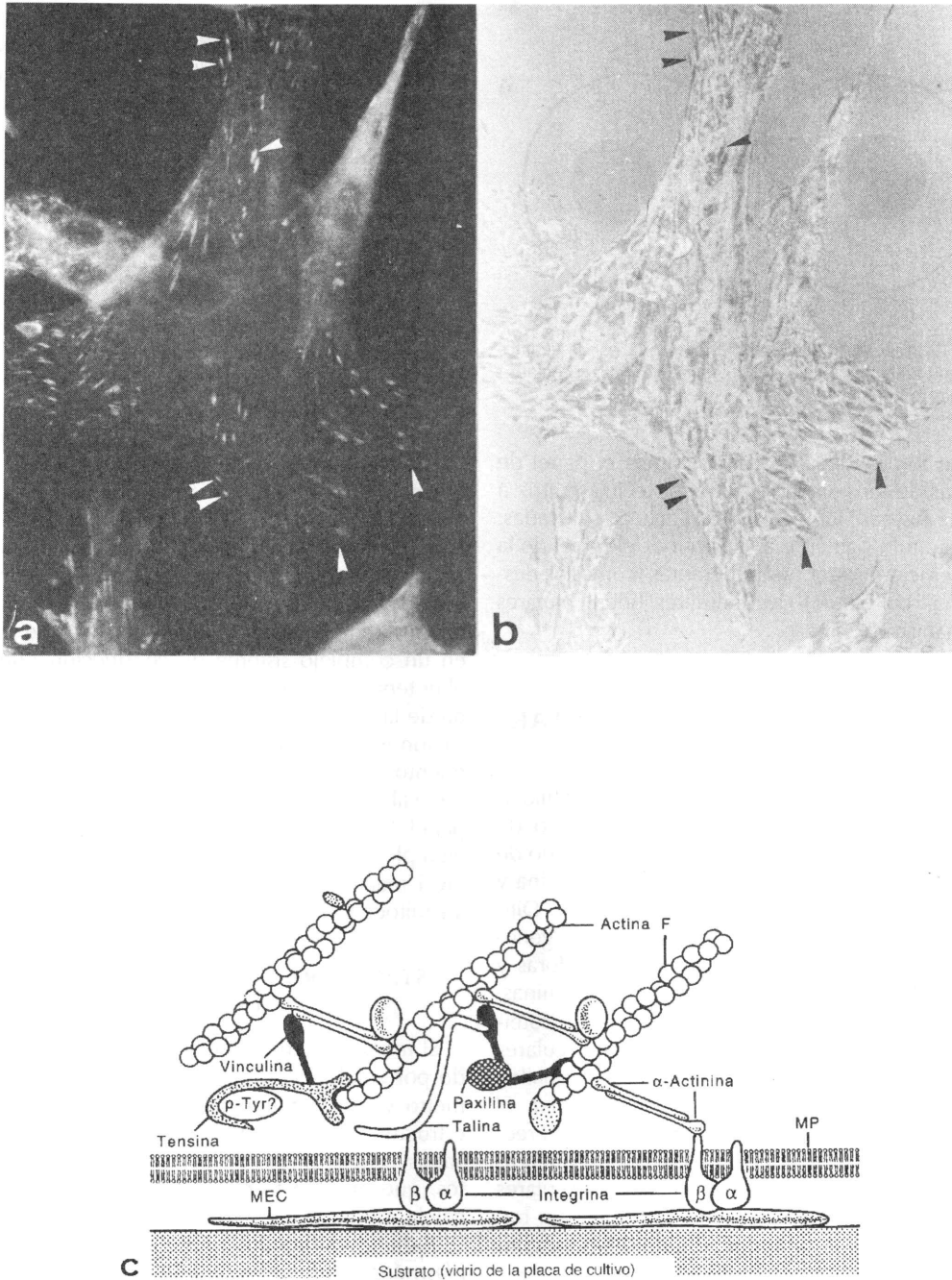


FIG. 5-30. *a* y *b* son microfotografías, obtenidas con el microscopio óptico, de contactos focales entre fibroblastos de embrión de pollo y el soporte sobre el que están cultivados. *a* muestra los contactos focales, por inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal que inhibe la adhesión y marca los sitios de una proteína localizada en esas zonas. *b*. La imagen por reflexión de interferencia correspondiente muestra los contactos focales como líneas oscuras. Las flechas indican algunos de los mismos contactos en ambas figuras. *c*. Modelo de la conexión, por medio de las integrinas, de los elementos del citoesqueleto de actina y proteínas asociadas, con la matriz extracelular a nivel de los contactos focales en cultivo de tejidos. Se representan tres de los microfilamentos de actina de una fibra de tensión, relacionados entre sí por el entrelazamiento proteico que comprende α -actinina, vinculina, talina, tensina y paxilina, principalmente. Existe una cantidad de proteínas asociadas que no están especificadas en el esquema. Las moléculas de la matriz extracelular (ECM) pueden ser fibronectina, laminina u otras. (Modificado de K. O. Simon et al. [1991].)

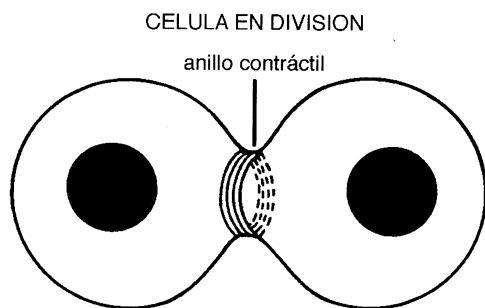


FIG. 5-31. Disposición submembranosa de la banda ecuatorial de microfilamentos que es responsable de la citocinesis en células animales.

Adhesión celular. Ya consideramos el papel de las fibras de tensión en la adhesión célula-matriz a nivel de los contactos focales en células cultivadas. En el capítulo siguiente analizaremos el papel de la actina en ciertas uniones adherentes (como los desmosomas en banda) de diferentes tipos celulares del organismo.

BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DEL MUSCULO

En la sección anterior estudiamos la motilidad general de las células y destacamos el hecho de que la contracción es esencialmente el resultado de la interacción de las proteínas contráctiles (actina y miosina) que forman parte del citoesqueleto. Dijimos también que, además de estas proteínas generadoras de fuerza, existen proteínas reguladoras y estructurales como la tropomiosina, las troponinas, la α -actinina y otras (tabla 5-1). Todas estas proteínas se encuentran no sólo en células no musculares sino también en el músculo, pero en éste se hallan dispuestas con una organización muy regular. El músculo está adaptado al acortamiento unidireccional durante la contracción. El grado de diferenciación funcional de algunas células musculares puede ser tan elevado como para producir un trabajo equivalente a mil veces su propio peso y contraerse cien veces o más por segundo.

A causa de esta especialización la mayoría de las células musculares son alargadas, tienen forma de huso y la mayor parte de su citoplasma está ocupado por las *miofibrillas* contráctiles (fig. 5-32). Estas son unidades cilíndricas situadas en el citoplasma, constituidas por manojos paralelos de filamentos.

En el músculo liso las miofibrillas son homogéneas y birrefringentes. Por el contrario, en el músculo cardíaco y esquelético las miofibrillas son estriadas y tienen bandas oscuras, birrefringentes (aniso-

tópicas). Veremos que la unidad estructural de la miofibrilla es el *sarcómero*. Dado que éste es también una unidad contráctil, a menudo se dice que la contracción en el músculo estriado es sarcomérica.

En las células musculares sólo una pequeña parte del citoplasma —el sarcoplasma— mantiene las características comunes a la generalidad de las células. Se distribuye entre las miofibrillas y es particularmente abundante alrededor del núcleo.

Las diferentes clases de células musculares se estudian en los textos de histología y los tipos especiales de contracción en los tratados de fisiología. Aquí analizaremos principalmente la organización macromolecular del músculo esquelético y el acoplamiento entre la excitación y la contracción.

El estudio de la biología molecular del músculo es uno de los ejemplos más interesantes de la íntima asociación entre estructura y función y de la manera como la energía química se traduce en trabajo mecánico. Otro terreno de interés, que hemos de cubrir en este capítulo, es el del acoplamiento entre excitación y contracción, que se basa en un complejo sistema de conducción que lleva el potencial de acción hacia la porción más profunda de la célula muscular, para producir la sincronización funcional de las miofibrillas. En este acoplamiento funcional el retículo sarcoplasmático, los iones calcio y la bomba de Ca^{2+} desempeñan un papel fundamental. El músculo es un admirable ejemplo de integración fisiológica y estructural a nivel macromolecular, sólo comparable con el de las mitocondrias y los cloroplastos.

ESTRUCTURA DE LA CELULA MUSCULAR ESTRIADA

El músculo estriado del esqueleto está constituido por células cilíndricas de 10 a 100 μm de diámetro y varios milímetros de largo. Esas enormes estructuras se originan en el embrión por fusión de varias células primordiales denominadas *mioblastos*, que primero forman un *miotubo* y luego una célula muscular completamente diferenciada.

Toda la célula se halla rodeada por la *membrana plasmática* ("sarcolema"), que está polarizada eléctricamente con un potencial de alrededor de $-0,1$ voltio, con la superficie interna negativa respecto de la externa. Esta membrana se despolariza fisiológicamente cada vez que un impulso nervioso alcanza la placa motora del músculo (placa mio-neural) y activa la membrana. El resultado final es la contracción de manera coordinada.

En la célula muscular existen tres componentes citoplasmáticos cuya importancia es fundamental para la contracción. Uno de ellos está representado por la *maquinaria contráctil de los miofilamentos*,

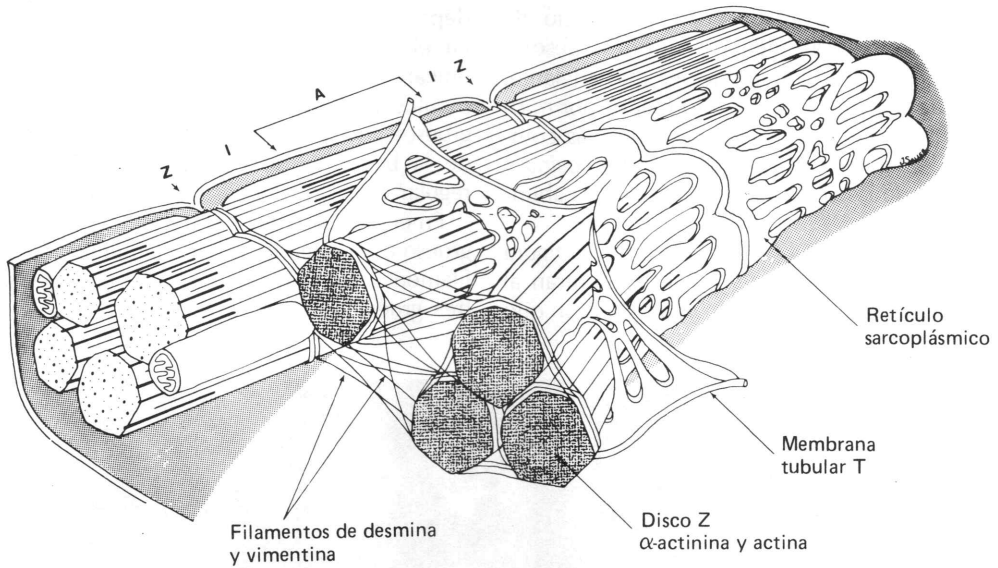


FIG. 5-32. Esquema de una fibra de un músculo estriado que muestra las miofibrillas con los sarcómeros, el retículo sarcoplásmico y las invaginaciones de la membrana plasmática (túbulos T). Se destaca la organización de los discos Z que contienen α -actinina, desmina, vimentina y otras. Z, línea Z; I, banda I; A, banda A. (Cortesía de E. Lazarides.)

constituida de manera fundamental por proteínas y que se desarrolla embriológicamente dentro de la matriz citoplasmática. Los miofilamentos se disponen en paralelo para formar estructuras fibrilares, las *miofibrillas* (fig. 5-32).

Como se menciona más adelante, la disposición de los miofilamentos determina los diferentes tipos de músculo. Por ejemplo, en los músculos esqueléticos y en el miocardio de los vertebrados, los filamentos se encuentran orientados longitudinalmente y existe una organización transversal que se repite de modo regular. En otros tipos de músculo, no estriado, los filamentos se orientan en forma longitudinal u oblicua, o se distribuyen más o menos al azar.

El segundo componente del músculo estriado es una diferenciación especial del sistema de endomembranas que constituye el *retículo sarcoplásmico*, relacionado con la regulación de la concentración citosólica de calcio en el ciclo contracción-relajación (fig. 5-32).

El tercer componente importante son las *mitocondrias*, que reciben el nombre de sarcosomas y que en ciertos casos alcanzan dimensiones considerables. La abundancia de mitocondrias depende de la frecuencia con la cual se contrae el músculo. En el miocardio, que tiene una contracción sostenida, se las encuentra en gran cantidad. En las enfermedades mitocondriales, que se transmiten como *herencia citoplasmática*, el corazón es justamente uno de los órganos afectados de manera casi constante.

5-31. La miofibrilla y el sarcómero son estructuras diferenciadas para la contracción

Las *miofibrillas* son estructuras cilíndricas alargadas de alrededor de 1 μm de diámetro, cuyas estriaciones resultan de la repetición de una unidad fundamental, el *sarcómero*, limitado por una línea densa, la *línea* o *disco Z* (fig. 5-33). Esta línea se localiza en el centro de una zona menos densa, conocida como *banda I*, que corresponde al disco relativamente isotrópico. La *banda A*, denominada así por ser *anisotrópica* (birrefringente) a la luz polarizada, tiene una densidad mayor que la banda I (para la definición de isotropía y anisotropía véase el capítulo 3-1). En ciertas condiciones se distingue una zona menos densa en el centro de la banda A, que la divide en dos semidisos oscuros. Esta zona constituye el *disco H* (disco de Hensen), en cuyo centro puede observarse la *línea M*.

En un músculo de mamífero en relajación, la banda A mide alrededor de 1,5 μm de largo y la banda I 0,8 μm . Las estriaciones de las miofibrillas son el resultado de una variación periódica en la densidad, es decir, en la concentración del material a lo largo del eje, y como se encuentran al mismo nivel en diferentes miofibrillas, confieren un aspecto estriado a la fibra entera.

5-32. Los miofilamentos gruesos y finos son los componentes macromoleculares contráctiles

Morfológicamente se distinguen dos clases de miofilamentos: los *gruesos*, de 10 nm de espesor y

1,5 μm de largo, separados por un espacio de 40 nm, y los *finos*, que tienen 5 nm de espesor y 1,0 μm de largo. Como se menciona más adelante, los miofilamentos gruesos están formados por *miosina* y los finos tienen una composición más compleja, con varias proteínas (*actina*, *tropomiosina* y *troponinas*), de las cuales la actina es la más abundante.

Como se aprecia en el esquema de la figura 5-34, ambos tipos de filamentos se encuentran al mismo nivel y se superponen en una extensión que

depende del grado de contracción del sarcómero. En el estado de relajación, la banda I contiene únicamente filamentos finos, la banda H sólo filamentos gruesos, y la banda A filamentos finos y gruesos que se superponen. En un corte transversal de la banda A, se observa mejor la disposición regular de las dos clases de filamentos (fig. 5-34).

En el músculo de los vertebrados, cada filamento grueso está rodeado de seis filamentos finos, y cada filamento fino se halla situado simétricamente entre tres gruesos. Como consecuencia de esa disposi-

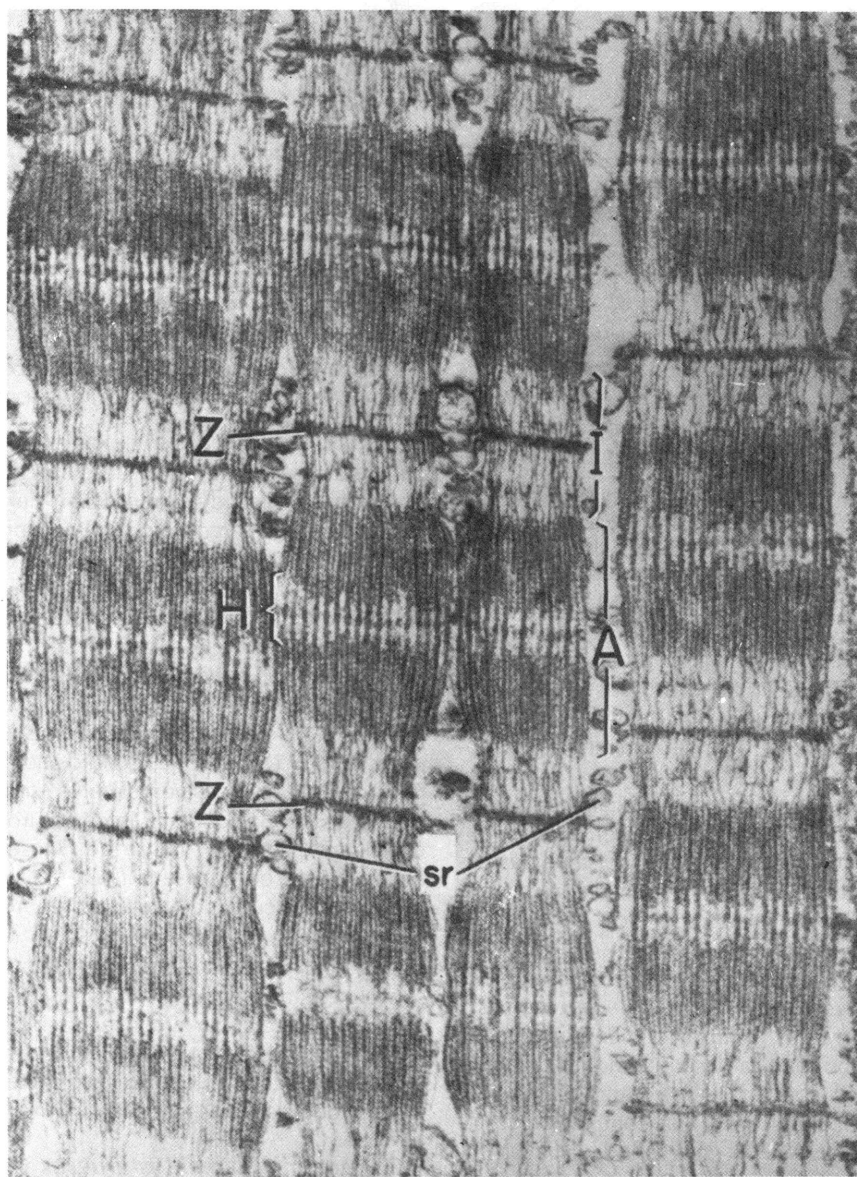


FIG. 5-33. Fotomicrografía electrónica de segmentos de cuatro miofibrillas en las que se advierten varios sarcómeros con la línea Z y las bandas H, A e I. sr, retículo sarcoplasmático situado entre las miofibrillas. Se puede observar la estructura fina de la miofibrilla con los miofilamentos gruesos y finos. 60.000 $\times$. (Cortesía de H. Huxley.)

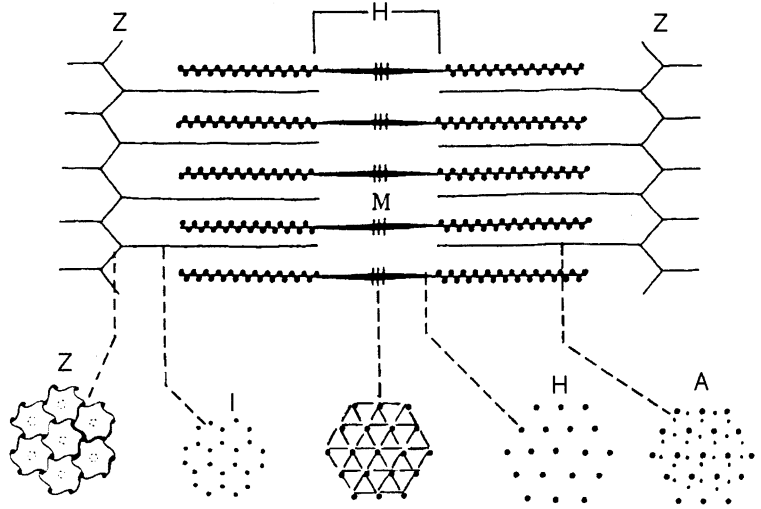


Fig. 5-34. Esquema de la estructura de un sarcómero en el músculo estriado. **Arriba.** Corte longitudinal. **Abajo.** Cortes transversales en las distintas regiones. Obsérvese que la banda I tiene sólo miofilamentos finos, la H sólo gruesos, y la banda A miofilamentos finos y gruesos. En las líneas Z y M se observan estructuras especiales.

ción, el número de filamentos delgados duplica al de los gruesos. Un corte que atraviese la banda H muestra únicamente miofilamentos gruesos, y otro que pase por la banda I, sólo miofilamentos finos.

Otro detalle importante que se pone de manifiesto con el microscopio electrónico es que los dos sistemas de filamentos se hallan conectados por puentes transversales. Estos puentes se originan a partir de los filamentos gruesos a intervalos de 7 nm y cada uno está situado a lo largo del eje con una diferencia angular de 60°. Ello significa que los puentes describen una hélice cada 43 nm. En este intervalo un miofilamento grueso se une a seis finos.

Luego de la coloración con acetato de uranilo puede observarse en la banda A, con microscopía electrónica, un período repetitivo de 43 nm. En cada mitad de la banda A, comenzando con la línea M, hay 11 bandas, algunas de las cuales se deben a los puentes transversales de miosina, pero otras se deben a la presencia de la proteína C (véase más adelante).

La compleja estructura de la banda A también se revela mediante la coloración negativa de cortes ultrafinos de músculo congelado. En un corte transversal a nivel de la línea M se ve que los filamentos gruesos tienen una disposición triangular (fig. 5-34).

5-33. La línea Z muestra un armazón cuadrículado y contiene α -actinina, desmina y vimentina

El corte transversal de la línea Z muestra un armazón cuadrículado (en forma de tejido de canasto), que no cambia durante la contracción. Este armazón está formado por filamentos Z que se conectan con los extremos [+] de los miofilamentos finos de la banda I. Se piensa que cada miofilamen-

to fino, al entrar en el disco Z, se continúa con tres filamentos Z curvos, que se unen con otros tres filamentos finos del mismo sarcómero. Los miofilamentos finos de los sarcómeros opuestos se disponen de la misma manera. La disposición hexagonal, que es característica de la banda A, se comprime en la región I-Z y se transforma en un dibujo cuadrículado que recuerda el tejido en canasta (fig. 5-34).

Este modelo, en el que los filamentos de un sarcómero no se continúan con los del adyacente, permite explicar por qué en ciertos casos puede ocurrir un clivaje a nivel del disco Z.

Se pueden aislar los discos Z por homogeneización del músculo, luego de la extracción de la actina y la miosina. En tales condiciones los discos Z de muchas miofibrillas quedan planos en el campo microscópico y es posible estudiar la localización de los principales componentes proteicos mediante inmunofluorescencia, con anticuerpos específicos. En la figura 5-35 se observa que la α -actinina ocupa la región central del disco, junto con la actina y una proteína de 85 kDa, mientras que la desmina y la vimentina se encuentran en la periferia (tabla 6-1).

Como veremos al final del capítulo, la desmina y la vimentina forman filamentos intermedios. Estos filamentos conectan las miofibrillas individuales en los discos Z y a todas ellas entre sí y con otros organoides, como se indica en la figura 5-32. Esta disposición del citoesqueleto del músculo asegura el alineamiento del aparato contráctil durante el ciclo de contracción-relajación.

La demostración de que el disco Z tiene dos porciones diferenciales plantea el interrogante acerca de cómo se arman durante la miogénesis en cultivos. Los estudios efectuados con anticuerpos fluorescentes demuestran que la primera en apare-

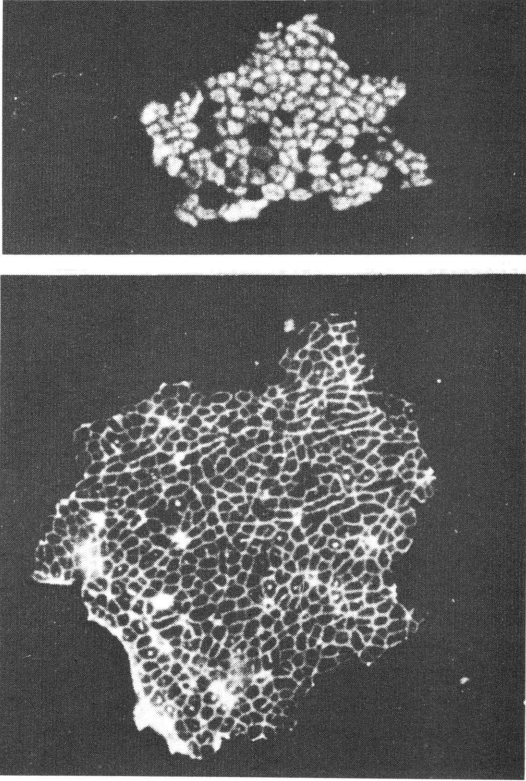


FIG. 5-35. Coloración inmunofluorescente de discos Z aislados del músculo esquelético. **Arriba.** α -Actinina localizada en la parte central del disco. 3200 $\times$. **Abajo.** Desmina localizada en la periferia (se obtienen resultados similares para la vimentina). 2180 $\times$. (Cortesía de E. Lazarides y B. L. Granger.)

cer es la α -actinina, con un aspecto puntiforme siguiendo los miofilamentos de actina. Más tarde, durante la miogénesis, la vimentina y la desmina se asocian a la α -actinina en el disco Z.

En el músculo en desarrollo se ha identificado una proteína denominada paranemina, de alto peso molecular (280 kDa). En los mitotubos esta proteína, junto con la desmina y la vimentina, se halla localizada en los miofilamentos citoplasmáticos, para asociarse más tarde con los discos Z. No obstante esto, con el desarrollo continuado del músculo la paranemina se reduce gradualmente y ya no se detecta en el músculo adulto.

5-34. Durante la contracción se produce el acortamiento de la banda I y la inversión de las bandas en el sarcómero

Con el microscopio de fases o de interferencia pueden observarse los cambios que ocurren durante la contracción en una célula muscular viva. Se observa que mientras la longitud de la banda A permanece constante, la banda I se acorta con el grado de contracción.

El acortamiento de la banda I se debe a que los miofilamentos finos se desplazan dentro del conjunto de los gruesos (fig. 5-36). Si la contracción continúa, hasta pueden penetrar en la banda H y, en casos extremos, amontonarse allí, para producir una banda de mayor densidad en el centro del sarcómero. Esto es lo que clásicamente se conoce como inversión de las bandas. También en este

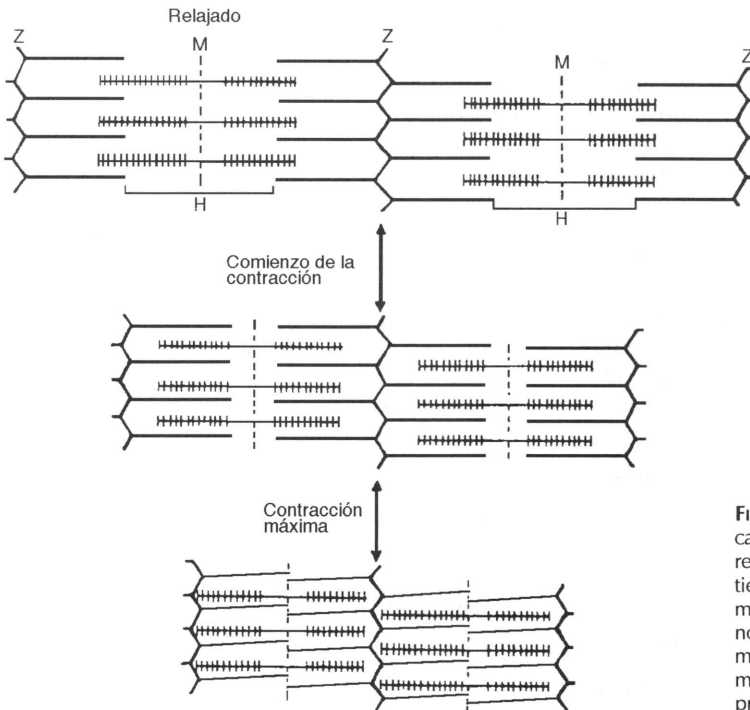


FIG. 5-36. Esquema que representa el mecanismo del deslizamiento. En el músculo relajado las bandas H son amplias y sólo tienen miofilamentos gruesos. Con el comienzo de la contracción los filamentos finos se deslizan hacia el centro del sarcómero. Con la contracción máxima los filamentos finos penetran en la banda H y se produce la inversión de las bandas.

caso extremo los filamentos gruesos se amontonan contra la línea Z. Tales hallazgos son interpretados dentro del mecanismo de deslizamiento de la contracción muscular, que será considerado con mayor detalle más adelante.

El grado de contracción alcanzado se puede determinar midiendo el largo del sarcómero (de una línea Z a la otra) en reposo y durante el acortamiento. En general, un músculo de insecto se acorta poco (alrededor de 12%) y el de un vertebrado mucho más (cerca de 43%).

ESTRUCTURA DE LA CELULA MUSCULAR LISA

5-35. El músculo liso carece de sarcómeros

En este tipo de musculatura la contracción es involuntaria, lenta, sostenida, y puede llegar a grados extremos de acortamiento.

El microscopio electrónico demuestra que los músculos lisos pueden tener una organización macromolecular variada. En muchos casos contienen miofilamentos finos y gruesos como los músculos estriados, pero faltan los sarcómeros con su periodicidad característica. En los moluscos y anélidos hay músculos con disposición helicoidal, en los que los miofilamentos gruesos y delgados están unidos por puentes transversales. En el músculo que cierra la valva de la ostra, que pertenece a la variedad de músculo con paramiosina, cada miofilamento se halla rodeado de aproximadamente doce miofilamentos delgados.

En el músculo liso de los vertebrados son difíciles de visualizar los miofilamentos gruesos que se reconocen en el estriado, ya que se arman a partir de moléculas de miosina sólo cuando éstas fosforilan sus cadenas livianas, luego del estímulo para la contracción.

ORGANIZACION MOLECULAR DEL SISTEMA CONTRACTIL

El conocimiento de la maquinaria molecular involucrada en la contracción muscular se ha vuelto cada vez más complejo. A las clásicas proteínas que generan la fuerza —miosina y actina— se les han agregado otras que cumplen una función reguladora, como la tropomiosina y las diversas troponinas. Finalmente, existen diversas proteínas que probablemente desempeñen un papel estructural, como la α -actinina, las proteínas de la banda M y la proteína C.

Aquí se considerarán estas proteínas desde el punto de vista de su relación con la estructura y la función de las miofibrillas.

5-36. Las moléculas de miosina constituyen los miofilamentos gruesos y las subunidades S_1 los puentes transversales

La miosina comprende alrededor de la mitad de la proteína total y tiene un peso molecular de 500 kDa. Esta gran molécula contiene dos cadenas polipeptídicas de alrededor de 200 kDa y cuatro menores de 20 kDa. Como se muestra en la figura 5-37, las dos cadenas pesadas forman una hélice doble de 14 nm de largo y 2 nm de espesor. Solo la mitad de la molécula es alargada; el resto, junto con las cadenas más pequeñas, se pliega formando dos regiones globulares en un extremo de la molécula.

La miosina se puede fragmentar experimentalmente mediante la acción de enzimas proteolíticas. La tripsina la rompe en *meromiosina liviana* alargada (LMM) y *meromiosina pesada* (HMM). Esta última puede subdividirse, por medio de la papaína, en la subunidad globular S_1 y en una molécula helicoidal S_2 que une la S_1 a la meromiosina liviana. La parte más importante de la molécula es la porción S_1 , dado que contiene la ATPasa y el sitio de unión a la actina. En efecto, la contracción depende de la interacción de la S_1 de la miosina con la actina.

Las moléculas de miosina comprenden varios isotipos en diferentes músculos, tanto en lo que se refiere a las cadenas pesadas como a las livianas. Por ejemplo, hay diferencias entre los músculos de contracción lenta y los de contracción rápida. Además, después de una deservación prolongada, la miosina lenta desaparece mientras que la miosina rápida persiste. Estos hallazgos sugieren que la organización molecular del músculo es plástica y que existe una continua regulación por medio de mecanismos nerviosos y no nerviosos.

En este punto es importante describir cómo se integran las moléculas de miosina para formar los miofilamentos gruesos. Cada uno de estos filamentos tiene una zona lisa en el centro (que corresponde a la banda H) y dos regiones en ambos extremos, donde la superficie es rugosa por la presencia de los puentes transversales. Estos se hallan formados por los extremos S_1 de la miosina, mientras que el tallo del filamento es la porción cilíndrica de la molécula. Como se observa en la figura 5-38, B, la mitad de las moléculas se orienta en sentido opuesto dentro del miofilamento. En otras palabras, hay una definida polarización de los extremos S_1 en cada mitad de miofilamento.

En cortes transversales de estos miofilamentos se ha observado una forma triangular, lo que ha llevado a proponer un modelo de 12 unidades paralelas. Cada unidad con un diámetro de 4 nm podría estar formada por dos moléculas de miosina.

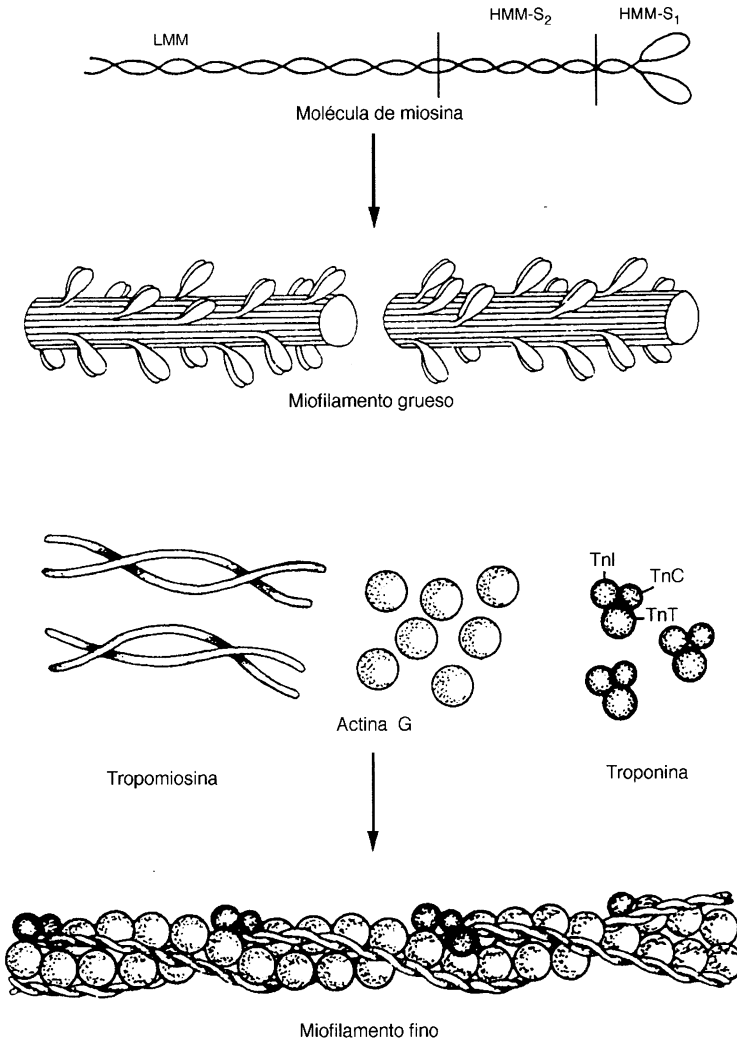


FIG. 5-37. Esquema de la estructura molecular de los miofilamentos gruesos (arriba) y finos (abajo) en la miofibrilla. La molécula de miosina está formada por dos cadenas polipeptídicas de 140 nm de longitud, con la cabeza S₁ en un extremo (LMM, meromiosina liviana; HMM-S₂, meromiosina pesada-S₂; HMM-S₁, meromiosina pesada-S₁). Obsérvese que el filamento grueso está formado por moléculas de miosina. El filamento fino es resultado de la asociación de monómeros de actina G, tropomiosina y troponinas (TnT, troponina T; TnC, troponina C, y TnI, troponina I). Advértase que cada molécula de tropomiosina se extiende a lo largo de 7 moléculas de actina.

Un corte transversal a nivel de la línea M revela la presencia de puentes que conectan los filamentos gruesos y forman una estructura hexagonal (fig. 5-34). Estos puentes representan la unión de la proteína M a la línea M del sarcómero.

5-37. Los miofilamentos finos están formados por actina, tropomiosina y troponinas

La actina representa alrededor del 25% de la proteína de la miofibrilla y su peso molecular es de 42 kDa. El miofilamento de actina está formado por una hélice doble cuyas cadenas se cruzan cada 36 a 37 nm. Por cada vuelta hay 13 a 14 monómeros globulares de actina G de 5 nm (fig. 5-37). En el músculo la actina está principalmente en forma fibrosa (actina F), como resultado de la polimerización de la actina G. En el músculo estriado la orientación de los filamentos de actina siempre es la

misma: los extremos [-] están libres, dirigidos hacia el centro del sarcómero, mientras que los extremos [+] se relacionan con las líneas Z.

La *tropomiosina* representa del 5 al 10% del total. Tiene un peso molecular de 64 kDa y es una molécula alargada de 40 nm formada por dos subunidades α -hélice. Como se muestra en la figura 5-37, la tropomiosina se extiende a lo largo de 7 monómeros de actina y da lugar a dos hélices que se colocan en los surcos de la doble hélice de actina.

Las *troponinas* constituyen una familia de tres pequeñas proteínas que forman un complejo de aproximadamente 80 kDa. Junto con la tropomiosina constituyen una especie de complejo sensible al Ca²⁺ dentro del filamento delgado, que regula la contracción. Cada uno de los grupos de tres troponinas se une a la tropomiosina cada 40 nm (es decir, cada siete monómeros de actina) (fig. 5-37). Los tres componentes, que se encuentran en pro-

porciones equimoleculares, son: 1) la *troponina C*, una pequeña proteína que fija específicamente el Ca^{2+} ; 2) la *troponina I*, que se une tanto a la actina como a la troponina C e inhibe la ATPasa de la miosina, y 3) la *troponina T*, la subunidad más grande que se une a la tropomiosina y que también interactúa con las otras troponinas. Se ha considerado a la troponina como una especie de gatillo localizado que controla el movimiento de la tropomiosina en el filamento delgado.

El microscopio electrónico reveló que el complejo troponina tiene la forma de un renacuajo con una región globular, compuesta principalmente por troponina C e I, y una larga cola que interactúa con la tropomiosina y que corresponde principalmente a troponina T. Se sugirió que esta interacción en sentido longitudinal podría ser importante en la regulación del proceso de gatillo.

Proteínas estructurales y reguladoras

Entre las proteínas estructurales consideramos las siguientes:

α -actinina. Es una molécula en forma de bastón de aproximadamente 100 kDa, localizada en el disco Z, que relaciona entre sí los extremos [+] de los filamentos.

Proteína 85 K. Dijimos antes que en la región central del disco Z se encuentra otra proteína de 85 kDa.

Proteína C. Se halla en la banda A en la región media del filamento de miosina. Con microscopía electrónica se localiza en 7 a 9 bandas transversales en cada mitad de la banda A.

Proteínas de la línea M. En el centro de la banda H se han descrito algunas proteínas especiales que forman parte de la línea M. Además de la creatina quinasa, existe una proteína estructural denominada miomesina. Esta proteína de 165 kDa puede detectarse ya en los mioblastos y tiene una gran afinidad por la miosina. La miomesina representa un marcador específico durante la diferenciación de los mioblastos a miotubos y fibras musculares. Se encuentra en el músculo esquelético y cardíaco, pero no en el músculo liso, y aparentemente desempeña un papel clave en la organización molecular de los miofilamentos gruesos. Mediante el uso de anticuerpos monoclonales se ha identificado otra proteína de la línea M de 185 kDa.

Titina. Es una proteína elástica del músculo caracterizada por su altísimo peso molecular (3×10^6 kDa), que representa el 8 al 12% de la masa miofibrilar. Al microscopio electrónico la titina se presenta como filamentos delgados y sumamente largos (más de $1 \mu\text{m}$). Se trata de macromoléculas flexibles elásticas que se extienden desde la línea Z hasta los filamentos gruesos. Dadas sus propiedades elásticas, parecen estar dispuestas para centrar a los filamentos de miosina o contribuir a generar tensión pasiva cuando el músculo es estirado.

Nebulina. También es una proteína muy grande, relacionada con los filamentos de actina, que podría actuar durante la histogénesis para regular el ensamblado de los filamentos y controlar su largo.

Distrofina. Ya descrita en el capítulo 4 al analizar el citoesqueleto de membrana, conecta a la actina de los miofilamentos con proteínas transmembranosas del sarcolema.

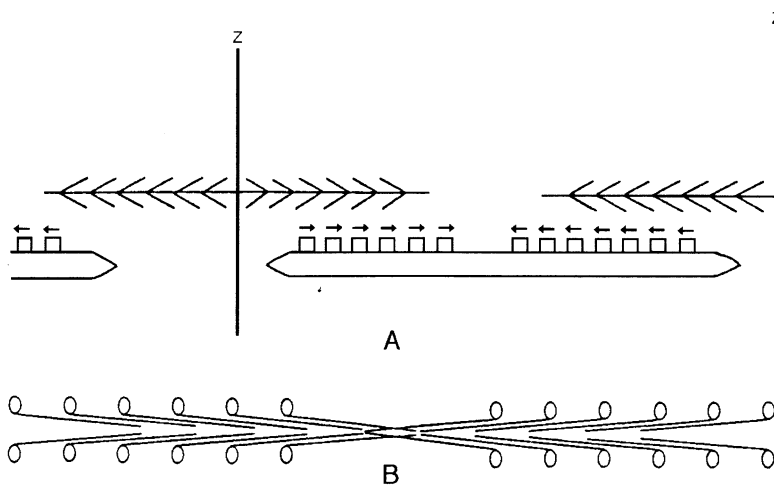


FIG. 5-38. A. Esquema que ilustra la polaridad de los puentes transversales en los filamentos de miosina y en los miofilamentos de actina. Las fuerzas de deslizamiento tienden a mover los filamentos de actina hacia el centro del sarcómero. (De H. Huxley.) **B.** Disposición de las moléculas de miosina dentro de los filamentos gruesos. Cada molécula tiene la forma de un renacuajo, con una cabeza globular y una cola. El centro del filamento está formado por el conjunto de las colas. Se observa que las moléculas están polarizadas en cada mitad del miofilamento. (De H. Huxley.)

5-38. El mecanismo de deslizamiento y la contracción muscular

Dijimos antes que la contracción se explica por el *mecanismo de deslizamiento*, mediante el cual los filamentos de actina se desplazan con respecto a los de miosina durante cada ciclo de contracción-relajación. La fuerza generada es proporcional al grado de superposición entre los filamentos gruesos y delgados. Esto implica que la fuerza sea de corta distancia, y es producida directamente por los puentes transversales entre los filamentos.

En reposo el músculo es plástico y extensible porque los puentes transversales no están unidos y se deslizan por la fuerza aplicada (fig. 5-39, A). Se piensa que el movimiento de deslizamiento proviene de la interacción repetida de los puentes transversales con los filamentos de actina.

El mecanismo de deslizamiento muscular sería el siguiente:

- a) un puente transversal se une a un sitio específico del filamento de actina;
- b) el puente transversal sufre un cambio de conformación que desplaza el punto de unión hacia el centro de la banda A, arrastrando consigo al filamento de actina, y simultáneamente se une un nuevo puente transversal;
- c) al final del ciclo, el primer puente adopta la configuración inicial en preparación para un nuevo ciclo.

Los filamentos de actina de cada mitad del sarcómero son traccionados como cuerdas hacia el centro del sarcómero por los brazos de la miosina que oscilan en una y otra dirección (fig. 5-39, B-D).

La energía para esta interacción es proporcionada por el ATP, degradado por la actividad ATPásica presente en el puente transversal. Se calcula que la energía liberada por un ATP basta para que cada puente transversal de la miosina se desplace entre 5 y 10 nm.

5-39. Tanto la miosina como la actina tienen una polarización definida dentro del sarcómero

Una de las características salientes del músculo es la organización molecular que le permite que sus moléculas interactúen, espacial y temporalmente, de manera coordinada. El mecanismo de deslizamiento depende de la interacción, muy específica, entre actina y miosina y requiere que ambas tengan una polarización bien definida dentro del sarcómero. En cada mitad del sarcómero estas moléculas exhiben una polarización diferente y las fuerzas que se desarrollan presentan direcciones opuestas (fig. 5-38, A).

Los miofilamentos observados con el microscopio electrónico presentan la estructura señalada en la figura 5-38, B. Las moléculas de cada mitad del filamento de miosina se encuentran en dos conjuntos antiparalelos con una inversión de la polaridad estructural en el centro. Los extremos barbados o [+] de los filamentos de actina, como ya vimos, se insertan en las líneas Z.

5-40. La contracción muscular comprende la formación y ruptura cíclica de las uniones actina-miosina

Los clásicos experimentos de Szent-Györgyi demostraron que la mezcla de actina y miosina en un tubo de ensayo da lugar al complejo actomiosina, que se contrae en presencia de ATP. Al seguir esta interacción con el microscopio electrónico, se observa que las moléculas de miosina se unen a las

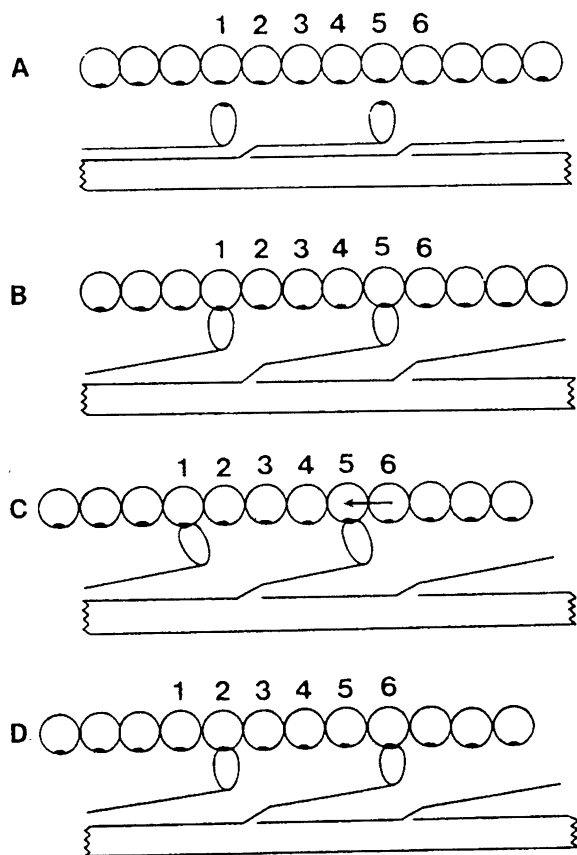


FIG. 5-39. Interpretación muy esquemática del modo de acción de los puentes transversales en el deslizamiento de los miofilamentos. **A.** En el estado de relajación los puentes S₁ no se unen al filamento de actina. **B.** Al comienzo de la contracción se produce la interacción entre S₁ y la actina. **C.** Un cambio de conformación de S₁ hace que el filamento fino se mueva hacia el centro de la banda A. **D.** Al final de este movimiento, S₁ se desprende, vuelve a su configuración inicial y se une a la actina siguiente.

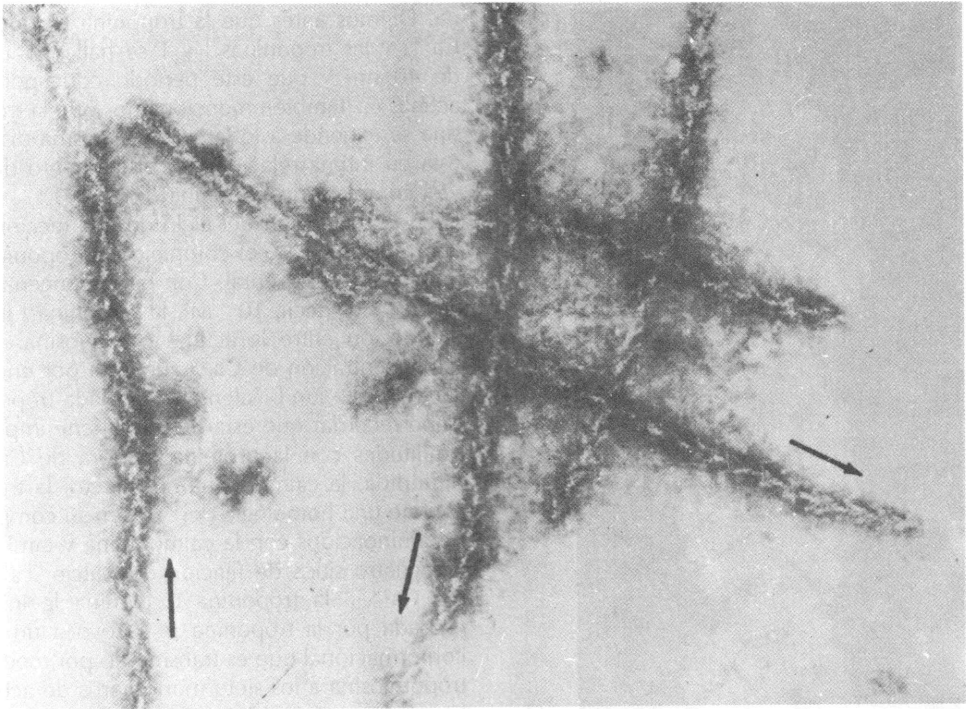


FIG. 5-40. Filamento de actomiosina que proviene de la interacción de actina y miosina (H-meromiosina). Obsérvese la polaridad en forma de flecha del complejo de actomiosina. Coloración negativa. 115.000X. (Cortesía de H. Huxley.)

de actina F con una orientación direccional. Como se aprecia en la figura 5-40, el complejo también puede ser producido con actina F y meromiosina pesada. Los filamentos de actina quedan "decorados" por la miosina, y todo el complejo se asemeja a una punta de flecha. Estos hallazgos demuestran que, en cada filamento de actina F, las moléculas de actina G están polarizadas con la misma orientación.

La figura 5-41 muestra un modelo que ilustra el doble filamento helicoidal de actina "decorado" por los fragmentos de la miosina S_1 . La configuración en punta de flecha que se observa en la micrografía electrónica de la figura 5-40 se debe a la inclinación y flexión de la miosina S_1 a lo largo de la hélice de actina F_1 .

La inclinación que presenta la miosina S_1 corresponde muy probablemente a la configuración que tiene el puente transversal al final del movimiento activo, es decir, cuando se liberaron el ADP y el Pi y no se origina ninguna fuerza de tracción. En cambio, la microscopía electrónica y la difracción de rayos X sugieren que en el músculo relajado los puentes se disponen en forma casi perpendicular al eje de los miofilamentos.

En resumen, la información obtenida hasta el momento acerca de los aspectos ultraestructurales y bioquímicos permite interpretar los mecanismos

macromoleculares inherentes a la contracción muscular. Puede afirmarse que se trata de un fenómeno cíclico, que implica la formación y ruptura, sucesivas y alternadas, de uniones actina-miosina entre ambos miofilamentos. En cada puente tiene lugar la siguiente secuencia:

- a) unión perpendicular entre una cabeza de meromiosina pesada y una unidad de actina G globular;
- b) ruptura de la unión por una molécula de ATP que se une a la cabeza de miosina;
- c) hidrólisis del ATP por la ATPasa miosínica activada por el Ca^{2+} ; esto produce un cambio conformacional en la miosina que conduce a:
- d) desplazamiento de la cabeza de miosina hacia el extremo $[+]$ del filamento fino;
- e) formación de un nuevo puente entre la misma meromiosina pesada y la unidad de actina G globular siguiente. Esta unión produce el desprendimiento del fosfato inorgánico liberado del ATP, lo que provoca a su vez una nueva modificación en la miosina (ahora unida firmemente a la actina), que cambia de forma propulsando el deslizamiento del filamento. El movimiento relativo del miofilamento delgado que se produce en cada ciclo sería equivalente al tamaño de la actina G (5,3 nm). En el curso de este movimiento la miosina pierde su ADP, y las condiciones vuelven a ser las mismas que en a). El ciclo se repite una y otra vez.

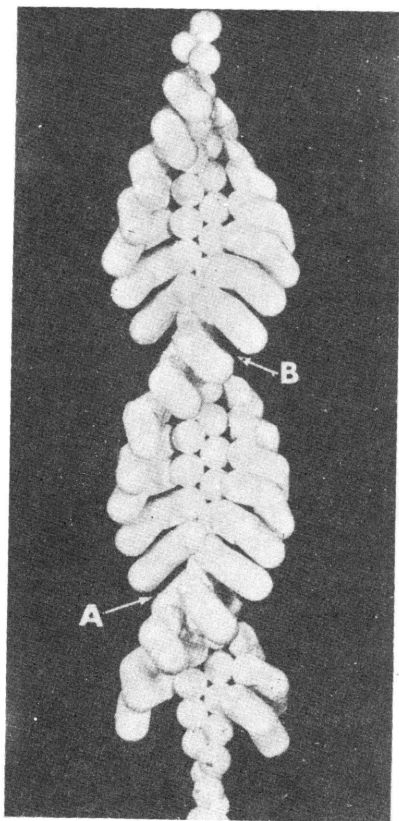


FIG. 5-41. Modelo tridimensional de un complejo de actina-tropomiosina. En el eje se encuentra el filamento helicoidal doble de actina F, formada por subunidades G. La actina fue tratada con fragmentos de meromiosina pesada (fragmento S_1). Los puntos marcados A y B son puntos de cruce en la hélice de actina. La forma de punta de flecha se produce por el cambio en la posición del punto de unión de la subunidad S_1 a las moléculas de actina. (De H. Huxley.)

REGULACION Y ENERGETICA DE LA CONTRACCION

Mencionamos antes que en el estado de relajación los puentes transversales están sueltos; en el estado de contracción permanente (rigor) se produce la condición opuesta. La rigidez cadavérica del músculo (*rigor mortis*) se debe a la unión permanente entre los puentes transversales y los miofilamentos finos, dado que su separación ocurre sólo por acción del ATP, y esta molécula obviamente ya no es producida por el cadáver.

Para que tenga lugar un ciclo de contracción-relajación es necesario un mecanismo por el cual los puentes transversales se unan y se liberen en forma cíclica. La transición entre reposo y actividad depende de la concentración del calcio libre en la vecindad de la maquinaria contráctil.

El control por el Ca^{2+} requiere la presencia de las proteínas reguladoras: tropomiosina y troponina.

Dijimos antes que la troponina C (que une el Ca^{2+}) y las troponinas I y T se hallan a intervalos de 40 nm y que este período corresponde a 7 actinas G. También mencionamos que la tropomiosina se extiende a lo largo de la misma distancia y está en íntima relación con el filamento de actina y el complejo de troponina (fig. 5-37).

En la regulación del ciclo de contracción-relajación por el calcio, el complejo de troponina tiene un papel fundamental. Con bajas concentraciones de Ca^{2+} (es decir, 10^{-7} M), la troponina I inhibe la interacción entre la actina y la miosina. Cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta por encima de 10^{-6} M, este ion bivalente se une a la troponina C. Cabe recordar que esta proteína tiene importantes similitudes con la proteína fijadora de Ca^{2+} más difundida, la calmodulina. En efecto, la troponina C tiene una homología del 50% en su composición de aminoácidos con la calmodulina y también posee cuatro sitios de fijación del calcio. La fijación del Ca^{2+} a la troponina C elimina la inhibición causada por la troponina I y provoca un cambio conformacional que es transmitido por medio de la tropomiosina a los siete monómeros de actina G a los cuales está asociada. Esta cadena de acontecimientos lleva a la contracción del músculo.

5-41. La regulación molecular implica el desplazamiento de la tropomiosina después de la unión del Ca^{2+} a la troponina C

Los estudios de microscopía electrónica y difracción de rayos X han permitido construir un modelo para explicar la acción reguladora del sistema tropomiosina-troponina C.

En la figura 5-42 se muestra este modelo en un corte transversal. La molécula de tropomiosina se ve en dos posiciones que corresponden al estado activado y al relajado. En esta última condición (contorno punteado), la tropomiosina se sitúa más profundamente en el surco de la actina I y bloquea el sitio de unión de la miosina con la actina.

Cuando el Ca^{2+} se une a la troponina C, se produce el desplazamiento de la tropomiosina que se aleja del surco y se expone el sitio de unión para la actina, lo que permite la interacción actina-miosina.

5-42. La energía de la contracción se origina por oxidación fosforilativa y por glucólisis

Mientras las miofibrillas constituyen la maquinaria mecánica del músculo, el combustible necesario es producido principalmente en el sarcoplasma. En todos los tipos de músculo gran número de mitocondrias, denominadas "sarcosomas", proporcionan los procesos esenciales de la fosforilación oxi-

dativa y del ciclo de Krebs (cap. 9). Estas mitocondrias son particularmente abundantes y de tamaño considerable en el músculo cardíaco, que se contrae continuamente, y en los músculos de las alas de ciertos pájaros e insectos, que deben batir a altísima velocidad.

La matriz sarcoplasmática contiene enzimas glucolíticas y también proteínas globulares como la mioglobina, sales y compuestos de fosfato de alto poder energético. El glucógeno se encuentra en la matriz como gránulos diminutos o glucosomas visibles con el microscopio electrónico. En el músculo existe alrededor de 1% de glucógeno y 0,5% de fosfocreatina como fuente de energía. El glucógeno desaparece con la contracción a través de la glucólisis, y de este modo se forma ácido láctico que puede transformarse en ácido pirúvico y entrar en el ciclo de Krebs (cap. 9).

La energía inicial necesaria para la contracción proviene del ATP. El ADP producido después de la contracción inicial se convierte nuevamente en ATP por medio de la glucólisis o a partir de la fosfocreatina. La fosforilación oxidativa constituye la última y más importante fuente de ATP.

ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION

El acoplamiento excitación-contracción es el mecanismo por el cual los impulsos eléctricos inducen la contracción muscular. Con la llegada del potencial de acción de la placa neuromuscular (inervación motora) tiene lugar la transmisión sináptica química (cap. 7). A su vez ésta produce la despolarización de la membrana, que se conduce luego en forma de potencial de acción a lo largo de la célula muscular e induce la contracción.

Veremos que en el mecanismo de acoplamiento los componentes esenciales son: 1) el tubo T, que conduce el potencial de acción al interior de la fibra muscular; 2) la liberación de Ca^{2+} a partir del retículo sarcoplasmático; 3) la inducción de la contracción por el Ca^{2+} (anteriormente explicada); 4) la reacumulación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático por intermedio de la bomba de Ca^{2+} , que da como resultado la relajación muscular. Por lo tanto, el estudio de este mecanismo implica el conocimiento de cada uno de los componentes.

5-43. El retículo sarcoplasmático tiene un componente longitudinal con cisternas terminales en relación con el sarcolema del tubo T

El retículo sarcoplasmático de las fibras musculares esqueléticas y cardíacas representa una de las especializaciones del retículo endoplasmático liso (cap. 8). Fue descrito con imprecisiones argén-

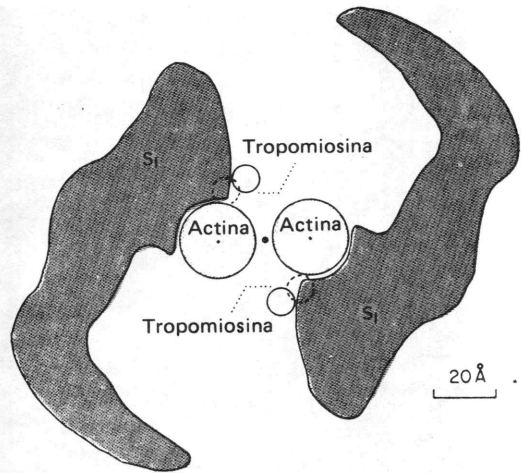


FIG. 5-42. Posible modelo molecular de la regulación de la contracción. El esquema muestra un corte transversal con las posiciones relativas de miosina S_1 y actina. El contorno punteado corresponde a la condición de relajación, en la que la tropomiosina se halla en la profundidad del surco de la actina F y cubre el sitio de unión de la miosina S_1 a la actina. (Cortesía de H. Huxley.)

ticas por Veratti, en 1902, como un retículo presente en el sarcoplasma de la célula muscular y que se extiende entre las miofibrillas. Este descubrimiento fue negado permanentemente hasta 1953, cuando Porter y Bennett publicaron las primeras fotomicrografías electrónicas de esta estructura.

El retículo sarcoplasmático es un sistema reticular continuo, limitado por membranas, cuya organización se superpone a la de los sarcómeros.

Como se ilustra en las figuras 5-32 y 5-43, el retículo sarcoplasmático aparece como una forma amplificada de retículo endoplasmático liso, con anchos túbulos que se anastomosan y que tienen una disposición preferentemente longitudinal. Estos túbulos cubren la superficie del sarcómero y terminan a nivel de las uniones de las bandas A e I (músculo esquelético de mamíferos) o de las líneas Z (miocardio y músculo esquelético de anfibios) por medio de cisternas terminales especiales. Entre las cisternas terminales consecutivas se interpone un estrecho tubo que es una extensión directa de la membrana plasmática de la célula muscular (véase más adelante), denominado tubo transversal o tubo T. Las dos cisternas terminales en aposición y el tubo T interpuesto, en conjunto, constituyen la denominada tríada (fig. 5-43).

5-44. El tubo transversal (o tubo T) es una profunda invaginación de la membrana plasmática que conduce impulsos hacia el interior

El tubo T es una dependencia de la membrana plasmática, organizada para conducir impulsos des-

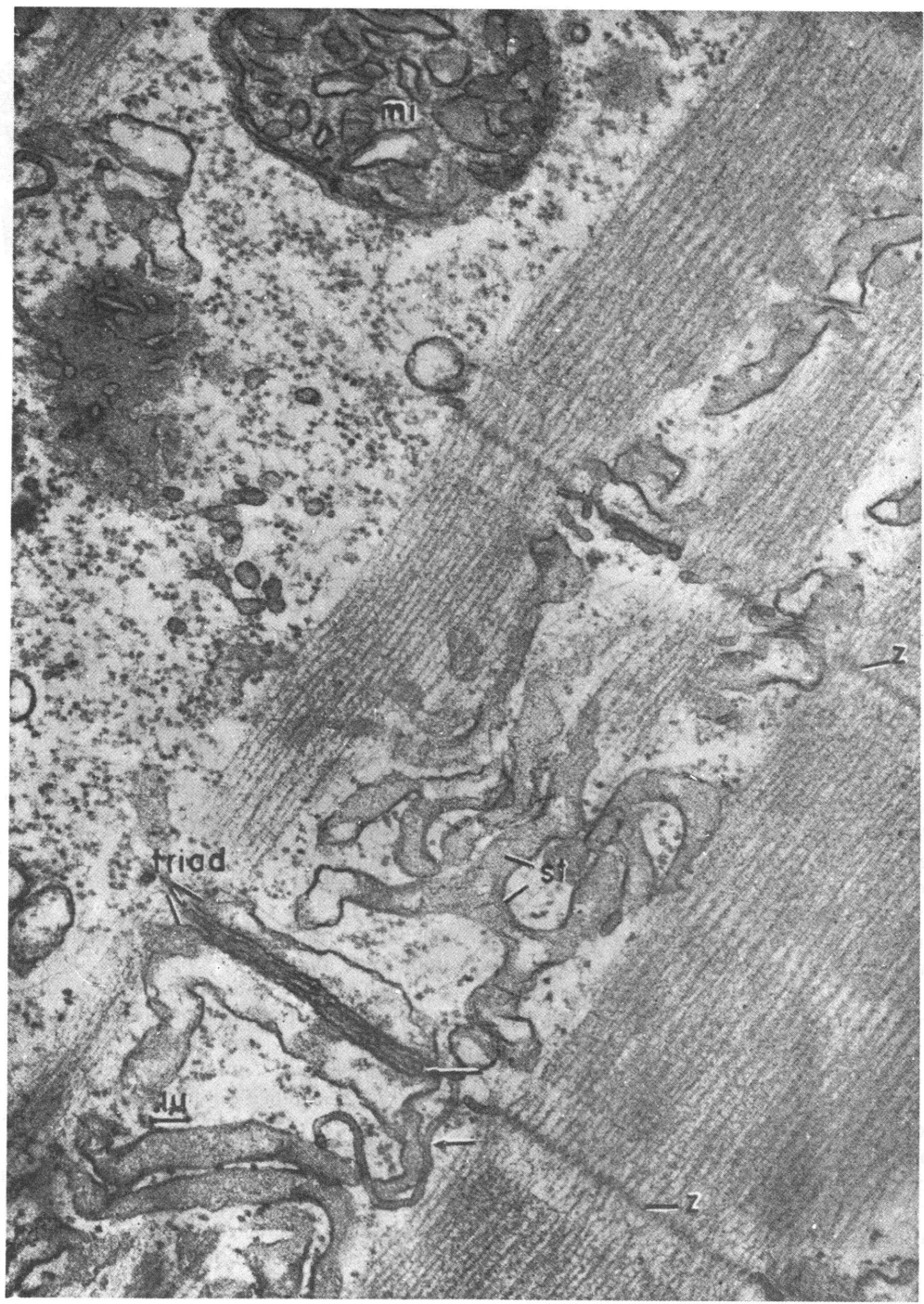


FIG. 5-43. Micrografía electrónica del músculo estriado que muestra dos miofibrillas, una de las cuales se encuentra cortada tangencialmente. Se observa el retículo sarcoplasmático bajo la forma de túbulos que se anastomosan (st) en la superficie del sarcómero y que componen también las cisternas terminales de la tríada. El sistema T, que es una invaginación directa de la membrana plasmática de la célula muscular, se aprecia en el centro de la tríada. Obsérvese la relación de la tríada con la línea Z, característica del miocardio de los mamíferos y del músculo esquelético de los anfibios. En el músculo esquelético de los mamíferos existen dos tríadas por sarcómero, a nivel de las uniones A-I. mi, mitocondria. (Cortesía de K. R. Porter.)

de la superficie de la célula muscular a las porciones más profundas de ésta.

Al principio, la continuidad entre el tubo T, la membrana plasmática y el espacio extracelular se demostró en forma indirecta. Si se sumerge un músculo de rana en una solución que contiene ferritina, se encuentra que estas moléculas opacas llenan el tubo central de la tríada. Estas observaciones sugieren que en la membrana plasmática del músculo hay pequeños orificios que se comunican directamente con el tubo T.

La función del tubo T es transmitir hacia el interior la señal eléctrica que producirá la liberación de Ca^{2+} al citosol para la contracción de las miofibrillas.

Al parecer el tubo T no es un canal pasivo, sino que está involucrado activamente en la conducción de los potenciales de acción.

Cuando se sumerge el músculo en glicerol se produce una lesión del tubo T y la abolición del mecanismo de acoplamiento.

La presencia del sistema de conducción intracelular explica la paradoja fisiológica de que todas las miofibrillas de una fibra de 50 a 100 μm de diámetro se contraigan rápidamente y en forma sincrónica, pese a que el potencial de acción pasa aparentemente sobre la superficie celular.

5-45. La estimulación libera Ca^{2+} de las cisternas terminales

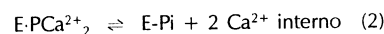
El Ca^{2+} se acumula principalmente en el componente longitudinal del retículo sarcoplasmático, de manera tal que su concentración se mantiene baja cerca de las miofibrillas (alrededor de 10^{-7} M). Cuando el músculo es estimulado, rápidamente se libera Ca^{2+} y su concentración aumenta (hasta 10^{-5} M), lo cual induce la contracción. La tríada desempeña un papel esencial en la liberación del Ca^{2+} , ya que la membrana del tubo T posee proteínas sensibles al voltaje. Al despolarizarse la membrana se induce un cambio conformacional de estas proteínas, que a su vez contactan e inducen la apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana de las cisternas terminales, previamente cerrados, con liberación localizada del Ca^{2+} . Por este motivo la tríada es el sitio más importante en el acoplamiento de excitación-contracción.

5-46 En el retículo sarcoplasmático se encuentra una bomba de Ca^{2+} (o ATPasa activada por Ca^{2+})

Hemos visto que durante la excitación se libera Ca^{2+} y que éste causa la contracción. Para que tenga lugar la relajación debe producirse el fenómeno opuesto. El Ca^{2+} debe ser retirado del cito-

sol, lo cual implica la intervención de la ATPasa activada por Ca^{2+} , que se halla en el retículo sarcoplasmático. Este sistema funciona como una bomba de Ca^{2+} que incorpora al catión por acción del ATP.

Las reacciones involucradas son las siguientes:



Se observa que la hidrólisis de una molécula de ATP determina la translocación de dos Ca^{2+} . La reacción es reversible.

Por fraccionamiento se puede aislar el retículo sarcoplasmático en forma de estructuras vesiculares. Estas vesículas contienen 40% de lípidos y dos proteínas principales. Son éstas la bomba de Ca^{2+} , que representa el 80% de la proteína de la membrana, con un peso molecular de 105 kDa, y la calsequestrina —o proteína que une el Ca^{2+} —, de 65 kDa.

El movimiento hacia adentro y hacia afuera del Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático está relacionado con la fosforilación y desfosforilación de la proteína que forma la bomba de Ca^{2+} . En presencia de Ca^{2+} y ATP esta proteína es rápidamente fosforilada y se acumula Ca^{2+} . En ausencia de ATP la proteína es desfosforilada y el calcio sale del retículo sarcoplasmático.

Puesto que tanto la ATPasa como la incorporación de Ca^{2+} son inhibidas por agentes bloqueadores de los grupos $-\text{SH}$, es posible llevar a cabo estudios citoquímicos con microscopía electrónica usando un reactivo que une ferritina a las moléculas del agente bloqueador de los grupos $-\text{SH}$. Se demostró así que los grupos activos de la ATPasa ligada a la membrana estaban localizados en la superficie externa del retículo sarcoplasmático aislado. Todos estos hallazgos indican que el retículo sarcoplasmático tiene a su cargo el importante papel de relajar la fibra después de la contracción y que ello se produce por la fijación de Ca^{2+} a la superficie externa y su transporte hacia el interior de las vesículas.

Por otra parte, la calsequestrina es la responsable de la fijación del Ca^{2+} dentro del retículo sarcoplasmático.

Resumiendo, la serie de cambios que se producen después de la llegada de la señal eléctrica son los siguientes:

- 1) la señal es recibida a nivel de la línea Z o de la unión A-I por intermedio del tubo T;
- 2) el acoplamiento del tubo T con las cisternas terminales produce la liberación de Ca^{2+} (esto puede ocurrir en un milisegundo);
- 3) el Ca^{2+} induce la contracción al permitir la interacción de actina y miosina por su efecto sobre

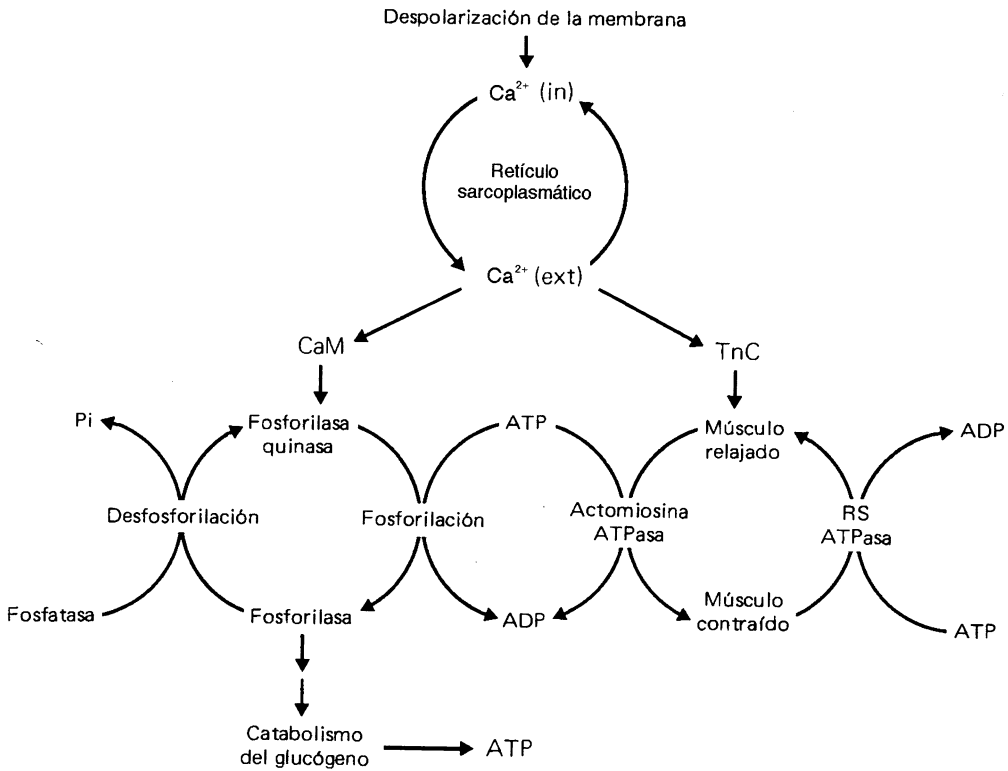


FIG. 5-44. Esquema general del papel de las proteínas fijadoras del calcio, calmodulina (CaM) y troponina C (TnC), en la contracción y relajación muscular. La CaM se relaciona con un sistema de fosforilación que produce el catabolismo del glucógeno. La TnC con el Ca²⁺ actúan sobre la actomiosina ATPasa para la contracción, y la relajación es controlada por la bomba de calcio del retículo sarcoplasmático (RS ATPasa). (Cortesía de J. R. Dedman y P. B. Moore.)

las proteínas reguladoras troponina y tropomiosina (durante esta etapa se usa ATP como fuente de energía);

4) el Ca²⁺ es retomado por el retículo sarcoplasmático por intermedio de la bomba de Ca²⁺ y la remoción del Ca²⁺ produce la relajación muscular.

La figura 5-44 muestra, en forma esquemática, de qué manera el Ca²⁺ liberado del retículo sarcoplasmático puede regular la función muscular. En ella se describe la intervención de la troponina C (TnC) y también de la calmodulina (CaM) junto con el acoplamiento de energía con el ATP, la intervención de la ATPasa de la actomiosina y la desfosforilación del retículo sarcoplasmático estimulada por la interacción con calmodulina-Ca²⁺. El estudiante debe tener presentes estos fenómenos moleculares interconectados que controlan la contracción y la relajación del músculo.

Todos los datos mencionados y los que conciernen al mecanismo de deslizamiento de la contracción pueden integrarse en una teoría de la contracción muscular. Este es uno de los mejores ejemplos hasta ahora estudiados de la estrecha relación entre los procesos que proporcionan energía y el mecanismo que interviene en la contracción. La

estructura y la función están tan íntimamente relacionadas dentro de la organización molecular del músculo que forman una unidad indivisible.

FILAMENTOS INTERMEDIOS

En el sentido de soporte puramente mecánico que originalmente se dio al término “citoesqueleto”, el paradigma de elemento citoesquelético lo constituyen los filamentos intermedios. Son estructuras fuertes, estables, insolubles, resistentes a los cambios de temperatura y dispuestas en densas redes tridimensionales en el citoplasma que se relacionan y forman parte de las uniones intercelulares. Soportan grandes tensiones sin romperse, al contrario de lo que ocurre con los microtúbulos y los microfilamentos. Pese a ser largos polímeros proteicos, no se encuentran en un estado de equilibrio dinámico con grandes reservas monoméricas, como es el caso de la tubulina y de la actina, sino que poseen una notable estabilidad.

Pese a ello, en algunas etapas de la fisiología celular son capaces de experimentar una profunda reorganización, como en la mitosis. Estos cambios

dependen, al menos parcialmente, de la acción regulada de quinasas específicas que fosforilan sus componentes.

El nombre de *intermedios* que recibieron estos filamentos se refiere a su diámetro de 9 a 10 nm, que los sitúa entre los 25 nm de los microtúbulos y los 6 a 8 nm de los microfilamentos citoesqueléticos.

Están compuestos por proteínas fibrosas que se combinan en dímeros helicoidales, los que a su vez se asocian para formar tetrámeros alargados. Las subunidades tetraméricas solubles se encuentran en pequeñas cantidades en las células, ya que la mayor parte de ellas se hallan constituyendo los filamentos.

A diferencia de los otros componentes del citoesqueleto que son estructuras polarizadas, los filamentos intermedios son *apolares*.

Cabe notar que estos filamentos están presentes en todas las células nucleadas formando también una fina capa compacta en la cara interna de la carioteca (vale decir que son intranucleares) denominada *lámina fibrosa*. En esta ubicación los filamentos están constituidos, en todos los tipos celulares, por tres proteínas relacionadas llamadas *láminas A, B y C*, respectivamente.

5-47. Pese a su semejanza ultraestructural, los filamentos intermedios constituyen un grupo heterogéneo

Pese a que este tipo de filamentos es similar desde el punto de vista funcional y estructural en todas las células, las proteínas que los constituyen son notablemente variables de un tipo celular a otro, y a veces en una misma célula a lo largo de su período vital.

Además de las láminas intranucleares ya mencionadas, existen cinco tipos principales de *filamentos intermedios citoplasmáticos*, y cada uno de ellos es característico de un determinado tejido o tipo celular (tabla 5-2). Además de los tipos principales,

existen algunos otros, como la periferina o la nesina de los neuroblastos, presentes en poca cantidad o durante cortos períodos de la vida de la célula.

La mayor parte de los tipos celulares de los vertebrados adultos poseen un solo tipo de filamentos intermedios citoplasmáticos, al menos como componente principal. Algunas células poseen más de un tipo y éstas suelen expresar vimentina como filamento principal, con otro asociado —por ejemplo, desmina—. Un fenómeno interesante es la expresión secuencial de filamentos intermedios durante el desarrollo embrionario, etapa en que las citoqueratinas aparecen mucho más extensamente distribuidas que en la vida adulta (recuérdese que en determinado momento el embrión es enteramente epitelial). Las células de Sertoli, por ejemplo, poseen citoqueratinas durante el desarrollo embrionario y vimentina durante la vida adulta.

5-48. El patrón de distribución celular de los filamentos intermedios es de importancia fundamental para el diagnóstico oncológico

Los métodos inmunohistoquímicos con fluorescencia o con peroxidasa permiten la identificación precisa de todos los tipos y subtipos de filamentos descriptos. En la mayor parte de los tumores benignos o malignos el patrón de distribución normal de filamentos intermedios de la célula originaria del tumor se conserva, de modo que su identificación inmunohistoquímica facilita enormemente el diagnóstico en casos de neoplasias muy indiferenciadas o de estirpe incierta.

5-49. Las citoqueratinas son características de los epitelios

Las citoqueratinas constituyen el tipo más complejo de filamentos intermedios; éste incluye 20 proteínas diferentes con un rango de peso molecular entre 10 y 68 kDa (sin incluir otras diez proteí-

TABLA 5-2. Principales tipos de filamentos intermedios

Tipo de filamento	Proteínas y masa	Distribución tisular en el adulto
Citoqueratina	Ácidas (40-70 kDa) Neutrobásicas (40-70 kDa)	Epitelios
Vimentina	Vimentina (54 kDa)	Derivados mesenquimáticos
Glioproteína fibrilar ácida	GPFA (50 kDa)	Astrocitos y células de Schwann
Desmina	Desmina (53 kDa)	Músculo
Neurofilamentos	NF-L, NF-M y NF-H (60-130 kDa)	Neuronas
Lámina fibrosa	Láminas A, B y C (65-75 kDa)	Lámina fibrosa nuclear de todas las células eucarióticas

TABLA 5-3. Composición molecular de los filamentos intermedios de citoqueratina en diferentes tipos epiteliales (Moll, 1982 y 1983)

<i>Tipo de epitelio</i>	<i>Grupo A (ácidas)</i>	<i>Grupo B (neutrobásicas)</i>
A. Epitelios simples	20 (46 kDa) o 18 (45 kDa)	8 (52,5 kDa) o 7 (54 kDa)
B. Epitelios estratificados		
Células corneales	12 (55 kDa)	3 (63 kDa)
Células no cornificadas	13 (54 kDa)	4 (59 kDa)
Células muy proliferantes	16 (48 kDa)	6 (56 kDa)
Células basales	19 (40 kDa) (tetrámeros)	—
Células basales y parabasales	15 (50 kDa), 17 (46 kDa) o 14 (50 kDa)	5 (58 kDa)
Células cornificadas	9 (64 kDa), 11 (56 kDa) o 10 (56,5 kDa)	1 (68 kDa) o 2 (65,5 kDa)

nas diferentes presentes en la uña y el pelo). A diferencia de lo que sucede con otros filamentos intermedios, la expresión de las citoqueratinas está controlada por una compleja familia de multigenes.

Los filamentos de citoqueratina son característicos de todas las células epiteliales. Son más abundantes en los epitelios estratificados que en los simples; en los primeros pueden llegar a ocupar gran parte de la masa citoplasmática de las células superficiales.

Las citoqueratinas, como componente estructural del citoesqueleto, forman parte importante de las uniones célula-célula y célula-matriz en los epitelios, por lo que generalmente se coexpresan con las proteínas características de los desmosomas o hemidesmosomas, como por ejemplo la desmoplacina, y constituyen junto con ellas una parte inseparable de una misma arquitectura organoide (cap. 8). Cabe recordar, sin embargo, que los desmosomas no son exclusivos de las células epiteliales, ya que existen en otros tipos celulares como las células de la aracnoides y en los endotelios, donde poseen vimentina, o en los cardiocitos, donde los filamentos son de desmina.

Del mismo modo, hay ejemplos de células no epiteliales que poseen citoqueratinas como componentes de su citoesqueleto: algunas células musculares lisas vasculares o del miometrio, algunas células endoteliales, del miocardio y miofibroblastos, especialmente de localización subpleural.

Las citoqueratinas han sido clasificadas y numeradas por Moll, sobre la base de su peso molecular y su comportamiento electroforético, como *ácidas* (tipo I o A) y *neutrobásicas* (tipo II o B). Los heterodímeros de citoqueratinas I y II pueden polimerizar en tetrámeros y filamentos, pero los homodímeros no, lo que explica por qué en cada filamento intermedio de citoqueratina se encuentra igual cantidad de proteína de tipo I y de tipo II (con excepción de los de citoqueratina 19). Como puede ver-

se en el esquema de Moll (tabla 5-3), cada par de citoqueratinas es muy característico de algunos tipos celulares.

Un caso interesante es el de la citoqueratina 20 (la más recientemente descrita), que comienza a expresarse en los enterocitos cuando éstos llegan a la superficie luminal del intestino junto con otros elementos de diferenciación luminal como las disacaridasas de las microvellosidades. Por otra parte, la citoqueratina 7 jamás aparece en el intestino. Estos elementos son de extrema utilidad en el momento de investigar el origen de un tumor maligno.

El par 8-18 es el más distribuido en los epitelios simples, pero también es el que más aparece en células no epiteliales.

5-50. La vimentina se expresa por lo general en derivados mesenquimáticos

Es el filamento intermedio característico de las células de origen mesenquimático, pero también es el más coexpresado junto con otro tipo de filamento intermedio, especialmente con las citoqueratinas, aunque otras asociaciones características son con la desmina en las células musculares lisas y con la GFAP en los astrocitos.

Con un peso molecular de 52 kDa, tiene una distribución predominantemente perinuclear, en íntima asociación con la carioteca, aunque puede distribuirse por todo el citoplasma.

5-51. La desmina se localiza en células musculares

Constituye el principal filamento intermedio de las células musculares lisas, estriadas y cardíacas. Su peso molecular oscila entre 50 y 55 kDa, y se encuentra formando una delicada red que vincula a las miofibrillas y sirve para mantener alineados los sarcómeros en los músculos estriados. A nivel de

cada banda Z, los filamentos de desmina forman una red plana que rodea a las miofibrillas y llega hasta la membrana plasmática. En el músculo liso los filamentos de desmina forman una compleja red tridimensional que se une a los cuerpos densos y a las placas densas, sitios característicos de anclaje también de la actina.

5-52. Los neurofilamentos forman el citoesqueleto de las neuronas

Los neurofilamentos están constituidos por tres polipéptidos principales, de peso molecular de 68, 160 y 210 kDa, respectivamente. Constituyen un rasgo sobresaliente del soma, las dendritas y el axón de las neuronas. Tienden a distribuirse uniformemente y a orientarse paralelos al eje longitudinal de las prolongaciones celulares. Poseen finos apéndices laterales que no se encuentran en los otros tipos de filamentos intermedios.

5-53. La glioproteína fibrilar ácida (GFAP) forma los filamentos de los astrocitos

Es el principal componente del citoesqueleto de los astrocitos, en los cuales se coexpresa con la vimentina. También aparece en pequeña cantidad en los plexos coroideos, en las células del epéndimo, en los oligodendrocitos inmaduros, en las células intersticiales de la pineal y en las células estrelladas de la hipófisis. Ocasionalmente se la ha encontrado en las células de Schwann.

BIBLIOGRAFIA

- Adams R. J. and Pollard T. D. (1986) Propulsion of organelles isolated from *Acanthamoeba* along actin filaments by myosin-I. *Nature* 322:754.
- Aebi U., Cohn J., Buhle L. and Gerace L. (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 323:560.
- Albers K. and Fuchs E. (1992) The molecular biology of intermediate filaments proteins. *Int. Rev. Cytol.* 134:243.
- Allen R. D. (1985) New observations on cell architecture and dynamics by video-enhanced contrast optical microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14:265.
- Alonso M. D., Lomako J., Lomako W. M. and Whelan W. J. (1995) A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* 9:1126.
- Amal I. and Wade R. H. (1995) How does taxol stabilize microtubules? *Curr. Biol.* 5:900.
- Amos L. A. (1985) Structure of muscle filaments studied by electron microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14:291.
- Azfelius B. A. (1995) Role of cilia in human health. *Cell Mot. Cytoskel.* 32:95.
- Barkalow K. and Hartwig J. H. (1995) Actin cytoskeleton: Setting the pace of cell movement. *Curr. Biol.* 5:1000.
- Barkalow K. and Hartwig J. H. (1995) The role of actin filament barbed-end exposure, cytoskeletal dynamics and cell motility. *Biochem. Soc. Trans.* 23:451.
- Burns R. G. (1995) Identification of two new members of the tubuline family. *Cell Mot. Cytoskel.* 31:555.
- Carlier M. (1991) Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* 266:1.
- Casella J. F., Casella S. J., Hollands J. A., Caldwell J. E. and Cooper J. A. (1989) Isolation and characterization of cDNA encoding the α subunit of Cap Z (36/32), an actin-capping protein from the Z line of skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5800.
- Caswell A. H. and Brandt N. R. (1989) Does muscle activation occur by direct mechanical coupling of transverse tubules to sarcoplasmic reticulum? *Trends. Biochem. Sci.* 14:161.
- Chen Y., Centonze V. E., Verkhovsky A. and Borisy G. G. (1995) Imaging of cytoskeletal elements by low-temperature high-resolution scanning electron microscopy. *J. Microsc.* 179:67.
- Chevrier V. et al. (1995) Identification of vinculin as a pericentriolar component in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 21:399.
- Cotran R. S., Kuman V. and Robbins S. L. (1994) *Pathologic Basis of Disease*, 5th Ed. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Davis D. R. et al. (1995) The phosphorylation state of the MAP tau as affected by glutamate, colchicine and β -amyloid in primary rat cortical neuronal cultures. *Biochem. J.* 309:941.
- Dhamodharan R. et al. (1995) Vinblastine suppresses dynamics of individual microtubules in living interphase cells. *Mol. Biol. Cell* 6:1215.
- Drenckham D. and Wagner J. (1986) Stress fibers in the splenic sinus endothelium in situ. Molecular structure, relationship to extracellular matrix and contractility. *J. Cell Biol.* 102:1738.
- Duprey P. and Paulin D. (1995) What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo? *Int. J. Dev. Biol.* 339:443.
- Edwards R. A. and Bryan J. (1995) Fascins, a family of actin bundling proteins. *Cell Mot. Cytoskel.* 32:1.
- Eldin P., Cormillon B., Mornet D. and Legger J. J. (1995) A new youth for myosins. *M/S-Med. Sci.* 11:1005.
- Fawcett D. W. (1994) Bloom and Fawcett. *A Textbook of Histology*, 12th Ed. Chapman and Hall, New York.
- Fawcett D. W. (1981) *The Cell*, 2nd Ed. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Fleischer S. and Inui M. (1989) Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 18:333.
- Forge V., Mintz E., Canet D. and Guillain F. (1995) Luminal Ca^{2+} dissociation from the phosphorylated Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum is sequential. *J. Biol. Chem.* 270:18271.
- Gibbons I. R. (1995) Dynein family of motor proteins: Present status and future questions. *Cell Mot. Cytoskel.* 32:136.
- Glover D. M., González C. and Raff J. W. (1993) The centrosome. *Sci. Am.* 268:32.
- Gown A. M. and Vogel A. M. (1984) Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. II. Distribution of filament proteins in normal human tissues. *Am. J. Pathol.* 114:309.
- Grekinis D., Reiman E. M. and Schlender K. K. (1995) Phosphorylation and inactivation of rat heart glycogen synthase by cAMP-dependent and cAMP-independent protein kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27:565.
- Habermacher G. and Sale W. S. (1995) Regulation of dynein-driven microtubule sliding by an axonemal kinase and phosphatase in *Chlamydomonas* flagella. *Cell Mot. Cytoskel.* 32:106.
- Hartwig J. H. (1995) Actin-binding proteins 1. Spectrin superfamily. *Protein Profile* 2:703.
- Hartwig J. H., Chambers K. A. and Stossel T. P. (1989) Association of gelsolin with actin filaments and cell membranes of macrophages and platelets. *J. Cell Biol.* 108:467.
- Hartwig J. H. and Kwiatkowski D. J. (1991) Actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:87.
- Hasson T. and Mooseker M. S. (1995) Molecular motors, membrane movements and physiology: Emerging roles for myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:587.
- Holmes K. C. (1995) The actomyosin interaction and its control by tropomyosin. *Biophys. J.* 68:52.

- Huxley A. F. (1969) The mechanism of muscular contraction. *Science* 164:1356.
- Janmey P. A. (1994) Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Ann. Rev. Physiol.* 56:169.
- Joki S., Toskala E., Saano V. and Nuutinen J. (1995) Ciliary ultrastructure and beating activity in rat and guinea-pig respiratory mucosa. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22: 619.
- Kabsh W. and Vandecherckhove J. (1992) Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21:49.
- Kalnins V. I. (1992) The Centrosome. Academic Press.
- Labeit S. and Kolmerer B. (1995) Titins: Giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 270:293.
- Lazarides E. (1980) Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283:249.
- Lee W.L. and Galbraith R. M. (1992) The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N. Engl. J. Med.* 326: 1335.
- Lehtonen E., Stefanovic V. and Saraga Babic M. (1995) Changes in the expression of intermediate filaments and desmoplakins during development of human notochord. *Differentiation* 59:43.
- Li Q. Q. and Joshi H. C. (1995) Gamma-tubulin is a minus-end specific microtubule binding protein. *J. Cell Biol.* 13: 207.
- McIntosh J. R. (1983) The centrosome as an organizer of the cytoskeleton. *Modern Cell Biology* 2:115.
- McIntosh J. R. and Porter M. E. (1989) Enzymes for microtubular-dependent motility. *J. Biol. Chem.* 264 (11):6001.
- Meyreleiner M., Chandler R., Schindler H. and Fleischer S. (1995) Phosphorylation with protein kinases modulates calcium loading of terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *Cell Calcium* 18:197.
- Mickey B. and Howard J. (1995) Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents. *J. Cell Biol.* 130:909.
- Mitchinson T. J. (1993) Localization of an interchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* 261:1044.
- Moll R., Franke W. W., Schiller D. L., Geiger B. and Krepler R. (1982) The catalogue of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11.
- Moll R., Lowe A., Laufer J., Franke W. W. (1993) Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.* 140: 427.
- Muchizuki Y., Park M. K., Mori T. and Kawashima S. (1995) The difference in autofluorescence features of lipofuscin between brain and adrenal. *Zool. Sci.* 12:283.
- Negretti N., Varro A. and Eisner D. A. (1995) Estimate of net calcium fluxes and sarcoplasmic reticulum calcium content during systole in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* 484:581.
- Oliver T., Dembo M. and Jacobson K. (1995) Traction forces in locomoting cells. *Cell Mot. Cytoskel.* 31:225.
- Ordoñez N. G. (1993) Immunocytochemistry in the diagnostics of soft tissue sarcomas. *Cancer Bull.* 45:13.
- Osborn M. and Weber K. (1983) Tumor diagnosis by intermediate filament typing: A novel tool for surgical pathology. *Lab. Invest.* 48:372.
- Paltiel Y., Weichselbaum A., Hoffman N., Eibschitz I. and Kam Z. (1995) Laser scattering instrument for real time in-vivo measurement of ciliary activity in human Fallopian tubes. *Hum. Reprod.* 10:1638.
- Payne M. R. and Rudnik S. E. (1989) Regulation of vertebrate striated muscle contraction. *Trends Biochem. Sci.* 14: 357.
- Pellman D., Bagget M., Tu H. and Fink G. R. (1995) Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement. *J. Cell Biol.* 130:1373.
- Pollard T. D. and Cooper J. A. (1986) Actin and actin-binding proteins: A critical evaluation of mechanisms and function. *Annu. Rev. Biochem.* 55:987.
- Prota G. et al. (1995) Comparative analysis of melanins and melanosomes produced by various coat color mutants. *Pigm. Cell Res.* 8:153.
- Rappaport R. (1986) Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 105:145.
- Rimm D. L., Koslov E. R., Kebriaei P., Cianci C. D. and Morrow J. S. (1995) $\alpha(1)(E)$ -catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8813.
- Roush W. (1995) Protein studies try to puzzle out Alzheimer's tangles. *Science* 267:793.
- Safer D., Golla R. and Nachmias V. T. (1990) Isolation of a 5-kilodalton actin-sequestering peptide from human blood platelets. *J. Biol. Chem., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2536.
- Saito A. et al. (1988) Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 107:211.
- Sanger J. M. et al. (1995) Increasing intracellular concentrations of tyrosin $\beta(4)$ in Ptk2 cells: Effects on stress fibers, cytokinesis and cell spreading. *Cell Mot. Cytoskel.* 31: 307.
- Satir P., Barkalow K. and Hamasaki T. (1995) Ciliary beat frequency is controlled by a dynein light chain phosphorylation. *Biophys. J.* 68:S222.
- Schwartz J. and Cole N. B. (1995) Roles for microtubules and kinesin in membrane traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Biochem. Soc. Trans.* 23:544.
- Shirakawa I., Oika K., Chaen S., Shimizu T., Tanaka H. and Sugi H. (1995) The mode of ATP-dependent microtubule-kinesin sliding. *J. Ex. Biol.* 198:1809.
- Shpetner H. S. and Vallee R. B. (1989) Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* 59:421.
- Steinert P. M. and Roop D. M. (1988) Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* 57:593.
- Stosiek P., Kasper M., Kartsen U. (1990) Expression of cytokeratins 8 and 18 in human Sertoli cells of immature and atrophic seminiferous tubules. *Differentiation* 43:66.
- Stossel T. P. (1989) From signal to pseudopod: How cells control cytoplasmic actin assembly. *J. Biol. Chem.* 264:1861.
- Stossel T. P. (1993) On the crawling of animal cells. *Science* 260:1086.
- Stryer L. (1990) *Bioquímica*, 3ª ed. Reverté, Barcelona.
- Takahashi K. (1995) Mechanisms of flagellar motility probed with microtechniques. *Cell Mot. Cytoskel.* 32:110.
- Thomas D. D. (1995) The mechanism of force generation in myosin. *Biophys. J.* 68:5135.
- Titus M. A. (1993) Myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:77.
- Tsugorka A., Ríos E. and Blatter L. (1995) Imaging elementary event of calcium release in skeletal muscle cells. *Science* 269:1723.
- Wattanapernpool J., Guo X. D. and Solaro R. J. (1995) The unique aminoterminal peptide of cardiac troponin I regulates myofibrillar activity only when it is phosphorylated. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27:1383.
- Yamazaki H., Nakata T., Okada Y. and Hirokawa N. (1995) KIF3A/B: A heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport. *J. Cell Biol.* 130:1387.
- Zot A. S. and Potter J. D. (1987) Structural aspects of tropomyosin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16:535.

6 / Superficie celular

Roberto Ponzio

En el capítulo 4 hicimos una descripción general de la estructura y función de la membrana plasmática; aquí hemos de referirnos a diferentes dominios especializados que se originan en el mosaico fluido de aquélla.

Veremos que en muchas células hay regiones especiales, visibles con el microscopio óptico o electrónico, que se adaptan a ciertas funciones específicas y que generalmente se denominan *diferenciaciones de la membrana celular*.

Algunas de ellas, por ejemplo las *microvellosidades*, se localizan en la superficie libre de ciertas células. Otras se ubican en las caras laterales, en contacto con otras células, y forman diferentes tipos de *uniones intercelulares* con el fin de adherir físicamente a las membranas adyacentes o conectar eléctrica o metabólicamente a células de los tejidos entre sí. Otras diferenciaciones, como los *hemidesmosomas* y las del tipo de los *contactos focales*, se encargan de adherir las células a las matrices extracelulares.

Otro objetivo de este capítulo es el estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales las células pueden “reconocer” diferentes tipos celulares o diversos componentes de las matrices extracelulares de los tejidos.

Veremos que los procesos de *reconocimiento*, de *comunicación intercelular* y de *adhesión molecular* tienen enorme importancia para el funcionamiento integrado de las células como un conjunto unificado y coherente dentro del organismo. Estas interacciones célula-célula y célula-matriz son mucho más complejas que lo que se suponía inicialmente; se demostró que las proteínas de las matrices extracelulares pueden modificar la expresión génica y servir de vehículos para la señalización mediada por citoquinas en la comunicación intercelular.

Las alteraciones de algunos de estos mecanismos de reconocimiento, adhesión y comunicación son una constante en patologías tan frecuentes como diversas; por ejemplo, en la transformación cancerosa, el sufrimiento tisular, o diversas malformaciones congénitas o enfermedades inmunitarias. La superficie celular es entonces uno de los campos fundamentales de la biología celular y molecular de las células tanto normales como transformadas.

DIFERENCIACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR

Dijimos que las diferenciaciones de la membrana celular corresponden a regiones identificables morfológicamente, adaptadas de manera especial para diferentes funciones como absorción, secreción, adherencia mecánica o interacciones con otras células o con las matrices extracelulares.

La figura 6-1 ofrece un esquema idealizado —aunque incluye muchas características de los enterocitos— de una célula epitelial cilíndrica, en la que pueden observarse distintos tipos de diferenciaciones de la membrana celular. Recordemos que estos dominios de membrana estructurados existen también en múltiples tipos celulares diferentes de los epitelios.

La célula representada en la figura proyecta delgadas prolongaciones de la superficie apical denominadas *microvellosidades*. En la superficie basal se observan *invaginaciones* de la membrana plasmática, que además está en relación con una gruesa *lámina basal* formada por material extracelular.

En el mismo esquema están representadas las principales *uniones intercelulares*. Como describimos más adelante, existen tres tipos principales: *uniones oclusivas*, *uniones adherentes* y *uniones comunicantes*.

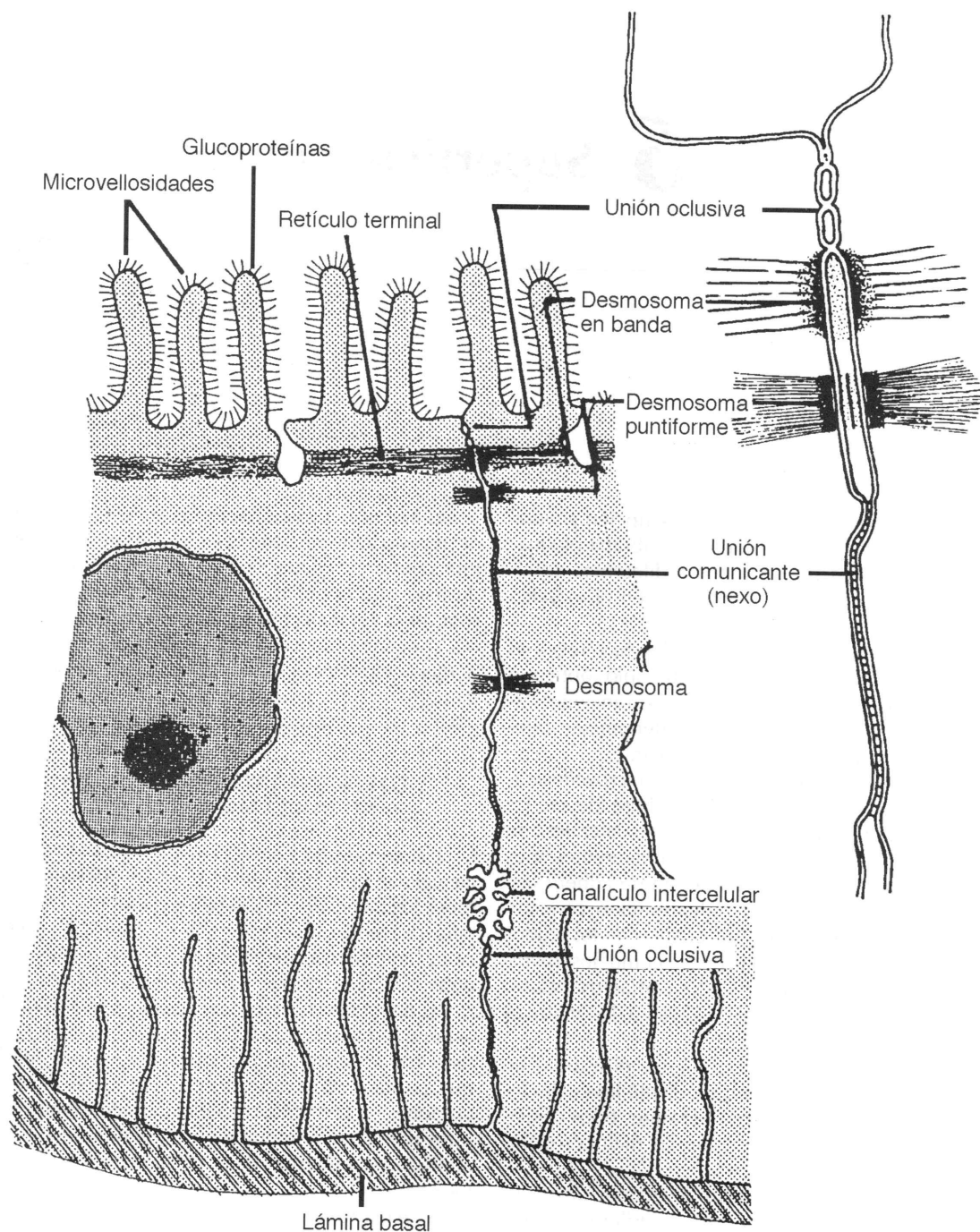


FIG. 6-1. Esquema que representa las principales diferenciaciones de la membrana celular, tal como se observarían en una célula epitelial cilíndrica ideal (aunque incluye muchas de las características del epitelio intestinal). A la derecha, con mayor aumento, se indican las diferenciaciones existentes entre dos células epiteliales. (Véase la descripción en el texto.)

6-1. Las microvellosidades amplifican la superficie celular

En los tejidos existen muchos procesos fisiológicos importantes que tienen lugar en la superficie

de las células. La intensidad de estos procesos por unidad de superficie de membrana no puede incrementarse más allá de ciertos límites, razón por la cual existen estructuras, como las microvellosidades, que permiten acrecentar la superficie disponi-

ble sin producir cambios apreciables del tamaño celular.

La mayor parte de las células que poseen superficies libres exhiben microvellosidades de diferentes tipos. Pese a que no son visibles con el microscopio óptico, el microscopio electrónico —especialmente el de barrido— revela que estas estructuras existen en células tan diversas como las mesoteliales, fibroblastos en cultivo, linfocitos, hepatocitos, ovocitos, etcétera.

En ciertos órganos, sus epitelios de revestimiento proyectan microvellosidades especialmente largas y numerosas hacia la superficie apical. Los histólogos clásicos las reconocieron con el microscopio óptico y les dieron el nombre de *chapa estriada* en los enterocitos, *ribete en cepillo* en el túbulo proximal del riñón y *estereocilios* en el epidídimo y conducto deferente.

En el epitelio intestinal, el microscopio electrónico permite identificar en la *chapa estriada* de los enterocitos miles de microvellosidades de 0,8 a 0,9 μm de longitud y 0,1 μm de diámetro, que representan prolongaciones citoplasmáticas cubiertas por la membrana plasmática en forma de dedos de guante. En 1 mm^2 de epitelio intestinal pueden encontrarse hasta 200 millones de estas microvellosidades, que aumentan la superficie disponible unas 20 veces. En el centro de cada microvellosidad existe un manojito de filamentos paralelos de actina, que son perpendiculares a los similares de la *red terminal* del citoplasma subyacente.

Como se ilustra en la figura 5-26, estos filamentos están polarizados con su extremo [+] dirigido hacia la membrana de la punta de la microvellosidad, estabilizados en esa zona por puentes de α -actinina y en relación con otras proteínas desconocidas que los conectan con la membrana. Además de la α -actinina, los manojos permanecen estructurados por puentes transversales de *villina*. También se puede identificar *fimbrina*. La membrana plasmática lateral de estas microvellosidades se une a la superficie lateral del manojito de microfilamentos por medio de la *miosina I*, que tal vez propulse a la membrana hacia el extremo apical de la prolongación. Además del hipotético traslado de la membrana plasmática, se atribuye a los filamentos de actina un papel estructural, ya que otorgarían una cierta rigidez a las prolongaciones. El papel morfogénico de la actina en la génesis de las microvellosidades sería similar al que cumple, al polimerizarse, en la formación de micropúas (cap. 5-30).

En la red terminal ya mencionada existen microfilamentos de actina en relación con miosina II, espectrina, tropomiosina y α -actinina, los que se extienden lateralmente hasta insertarse en los desmosomas en banda que flanquean a la célula. En

la parte inferior de esta red se ubica una capa de filamentos de citoqueratina. La función *in vivo* de la red terminal podría ser la de ejercer, por medio de sus proteínas contráctiles, una cierta tensión que podría mantener erectas a las microvellosidades.

La superficie externa de las microvellosidades intestinales está cubierta por una gruesa capa de material filamentososo, que da positiva la reacción de PAS para hidratos de carbono y corresponde al glucocáliz especialmente desarrollado que posee este tipo celular (cap. 4-4). Algunas de las prominentes glucoproteínas de esta cubierta celular son las responsables de la actividad enzimática de disacaridasas y oligopeptidasas que posee la membrana de la chapa estriada.

El *ribete en cepillo* de los túbulos renales es similar a la chapa estriada, pero de mayores dimensiones. Estas prolongaciones brindan la superficie de membrana necesaria para que los túbulos proximales reabsorban aproximadamente 150 litros de agua por día junto con gran parte de los solutos, que de otra forma se perderían con la orina. La membrana plasmática de la célula, entre la base de las microvellosidades, se invagina para formar las vesículas de pinocitosis responsables de la absorción de péptidos del fluido tubular.

Los *estereocilios* son microvellosidades de estructura interna similar a las anteriores, pero aún más largas y algunas veces con ramificaciones, que existen en el epitelio del epidídimo y del conducto deferente. A pesar de su nombre, no tienen ninguna relación estructural ni funcional con los cilios. Recuérdese que el epidídimo es un órgano que, entre otras funciones, realiza la reabsorción de parte del fluido que proviene del testículo junto con los espermatozoides. Los estereocilios proveen a este pequeño órgano de la superficie de membrana adecuada para cumplir con la mencionada función.

Como vimos en el capítulo 5-25, las células sensoriales del oído interno poseen una serie ordenada de largas prolongaciones rígidas del tipo de los estereocilios. En este caso especial, la función de los estereocilios es la de intervenir en la transducción sensorial.

6-2. La uniones intercelulares especializadas son un grupo heterogéneo de especializaciones de las membranas

Como dijimos anteriormente, este tipo de diferenciaciones de membrana existe en las células de casi todos los tejidos, pero alcanza su mayor grado de desarrollo en los epitelios. En algunos de éstos, como en el representado en la figura 6-1, existe un conjunto ordenado de uniones, identificado con el microscopio electrónico y descrito en 1963 por Farquhar y Palade con el nombre de *complejo de*

TABLA 6-1. Clasificación de las uniones celulares en vertebrados

Tipo de unión	Sinonimia	Filamentos asociados	Proteínas de unión
A. Unión oclusiva	<i>Zonula occludens</i> Unión estrecha	Actina	Ocludina
B. Uniones adherentes			
1) Desmosoma puntiforme	<i>Macula adherens</i> Desmosoma	Intermedios	Desmogleínas Desmocollinas
2) Hemidesmosoma (célula-lámina basal)	—	Intermedios	Integrinas
3) Banda de adhesión	<i>Zonula adherens</i> Unión intermedia Desmosoma en banda Desmosoma en cinturón	Actina	Cadherinas tradicionales (E, P, N)
4) Punto adherente	<i>Punctum adherens</i>	Actina	Cadherinas
5) Contacto focal (célula-matriz)	Placa de adhesión	Actina	Integrinas
C. Unión comunicante	Unión con espacio Unión con hendidura (<i>gap junction</i>) Nexo o <i>nexus</i>	—	Conexina

unión. En su descripción original este complejo estaba constituido por tres componentes: 1) una *unión oclusiva* (*unión estrecha* o "*zonula occludens*") cercana a la superficie luminal del epitelio; 2) un *desmosoma en banda* o *en cinturón* (*unión intermedia* o "*zonula adherens*") inmediatamente

por debajo de la anterior, y 3) *desmosoma puntiforme* ("*macula adherens*") de distribución irregular. Durante varios años hubo una tendencia a integrar dentro de uno u otro de los tres componentes del complejo de unión a todas las uniones visualizables, lo que llevó a una cierta confusión

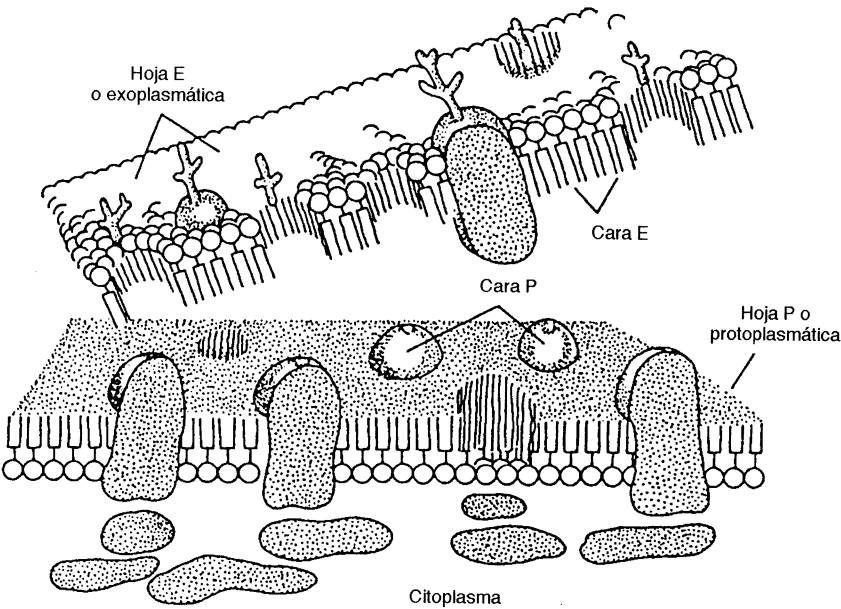


FIG. 6-2. Esquema de una membrana sometida al procedimiento de criofractura. Obsérvese que el plano de clivaje se produce siguiendo el contacto entre las capas lipídicas. La cara P corresponde a la hoja protoplasmática y muestra más proteínas intrínsecas que sobresalen en la superficie. La cara E corresponde a la hoja exoplasmática y puede mostrar fositas que corresponden a las proteínas intrínsecas de la otra hoja.

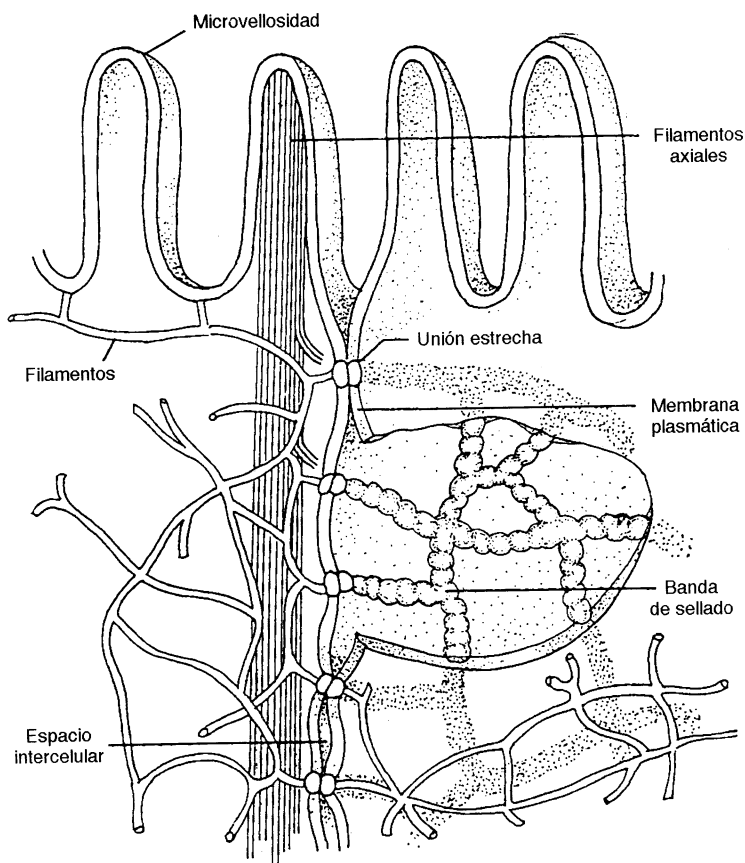


FIG. 6-3. Esquema de una unión oclusiva. Las membranas celulares adyacentes se mantienen firmemente unidas en la banda de sellado, que está compuesta por dos hileras de partículas, a la manera de un cierre de cremallera. (Véase la descripción en el texto.) (Copiado de L. A. Staehelin y B. Hull [1978].)

conceptual y de nomenclatura, ya que en el trabajo de Farquhar y Palade no se había identificado al cuarto componente microscópico de las uniones, que fue descrito posteriormente con el nombre de *unión comunicante*, *nexo* o *unión con espacio* o *con hendidura*. Una clasificación funcional de las uniones celulares estructuradas a nivel microscópico se presenta en la tabla 6-1.

6-3. Las uniones oclusivas forman barreras a la difusión paracelular

Las uniones oclusivas, estrechas o "*zonulae occludentes*" (en singular, *zonula occludens*) son regiones especialmente diferenciadas para cerrar el espacio intercelular y evitar de este modo el pasaje de sustancias a través de dicho espacio.

Estas uniones están situadas justamente por debajo del borde apical de muchas células epiteliales, de los mesotelios y de algunos endotelios, donde forman una región continua en las caras laterales de las membranas, a modo de anillo que rodea a las células en forma paralela a la superficie celular.

En un corte fino de microscopía electrónica, las dos membranas plasmáticas adyacentes aparecen como fusionadas en una serie de puntos (fig. 6-1).

A nivel de las zonas de aparente fusión las líneas densas externas de las unidades de membrana adyacentes parecen constituir una sola línea, lo que da a estas regiones una apariencia pentalamina.

El empleo de los métodos de congelación-fractura (fig. 6-2) permitió estudiar la organización tridimensional de las uniones estrechas. Aparecen como una red de elevaciones sobre la mitad citoplasmática de la membrana, con surcos complementarios en la mitad externa. Las elevaciones, en general, parecen hallarse formadas por dos hileras de partículas, en forma de cuentas de collar, cada una de ellas perteneciente a las células adyacentes (fig. 6-3). Las hileras de estas partículas producen el cierre del espacio intercelular y por ese motivo se las denomina *bandas de sellado*.

Los detalles de la estructura molecular de las uniones oclusivas es poco conocida. Se sugirió que la hilera de partículas de la banda de sellado sería el resultado de un artificio de técnica, dado que con el empleo de métodos de congelamiento rápido, aquella aparece como un par de cilindros invertidos (fig. 6-4) que corresponderían a micelas de lípidos situadas en la línea de fusión de la hoja lipídica externa de las membranas adyacentes; esta interpretación, sin embargo, es poco aceptada.

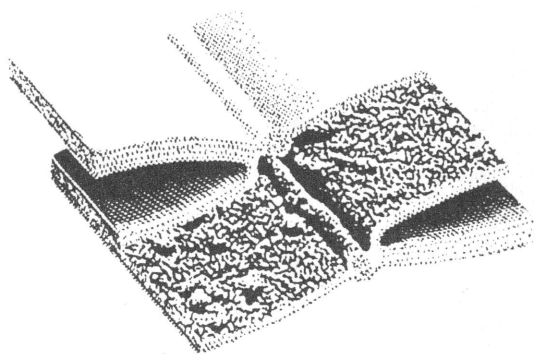


Fig. 6-4. Diagrama de una unión oclusiva observada luego de un congelamiento rápido seguido de fractura. En vez de la hilera de partículas que se ve en la figura 6-3 (con congelación lenta), en la banda de sellado se aprecia un par de cilindros invertidos, los que se interpretan como micelas lipídicas situadas en la línea de fusión. (Cortesía de B. Kachar y T. S. Reese.)

Recientemente se describió la existencia de una proteína transmembranosa, la *occludina*, que se une fuertemente con su equivalente de la célula adyacente. Estas proteínas estrechamente unidas forman hileras de partículas en cada membrana, reponsables del aspecto en bandas de sellado, que obliteran el espacio intercelular.

Hacia el lado citosólico de las bandas se han identificado dos proteínas asociadas constantemente con ellas (la ZO-1 y ZO-2, de las que existen varias isoformas), que unen la occludina a los microfilamentos del citoesqueleto, dándole cierta estabilidad a estas uniones.

El tratamiento con citocalasina B, que impide la formación de estos microfilamentos, anula la resistencia eléctrica a través de la monocapa —lo cual indica que estas uniones se separan— e imposibilita su resellado.

El grado de hermeticidad de un epitelio, que puede calcularse indirectamente por la resistencia eléctrica medida a través de él, guarda relación con la abundancia de las bandas de sellado, las que por otra parte son muy flexibles y adaptables a las necesidades fisiológicas del tejido. Los epitelios muy impermeables se caracterizan por tener numerosas bandas —hasta 50 o más en el caso de las células de Sertoli—, mientras que cuando las bandas son muy escasas —como en la vesícula biliar— puede existir cierto pasaje transepitelial. En la mayor parte de los endotelios, y en raros casos de epitelios como el del epéndimo, las uniones oclusivas faltan por completo y el tejido no presenta ningún obstáculo efectivo para el paso de sustancias.

La importancia de estas uniones en el bloqueo de los espacios entre células se puede evidenciar microscópicamente si se colocan en la superficie

epitelial trazadores opacos como ferritina o peroxidasa, ya que éstos no penetran a través del espacio intercelular sino que son detenidos a nivel de las uniones estrechas. Asimismo, la administración endovenosa de esos trazadores permite seguir su difusión desde los vasos hacia el tejido conectivo, desde donde atraviesan las láminas basales epiteliales y penetran por los espacios entre las células rumbo a la superficie, hasta ser detenidos por las uniones oclusivas.

Mediante este mecanismo, una lámina celular puede crear barreras a la difusión paracelular de sustancias hidrofílicas e iones a través de los epitelios, endotelios o mesotelios, y de esta forma delimitar territorios y separar compartimientos dentro de los distintos órganos, entre los órganos y las cavidades corporales o entre los órganos y el exterior del cuerpo.

Existen numerosos ejemplos de las denominadas *barreras hematotisulares* en diversos órganos, que en todos los casos dependen de la existencia de uniones oclusivas en distintas estructuras, y que crean por dentro de ellas un microambiente especial, diferente del que presenta el resto del organismo, en el que tienen lugar distintos procesos vitales de células especializadas.

La primera en ser descrita hace cerca de un siglo fue la *barrera hematoencefálica*. Al inyectar colorantes vitales por vía endovenosa a animales de experimentación, Ribbert observó que esas sustancias difundían rápidamente a través de las paredes vasculares y teñían la mayor parte de los órganos y tejidos del animal. El cerebro, sin embargo, permanecía libre de coloración, lo que indicaba un bloqueo al pasaje entre la sangre y el tejido nervioso que hoy sabemos que se debe a la presencia de uniones oclusivas entre las células endoteliales, que impiden el paso de sustancias hidrofílicas e iones entre ellas. Los nutrientes y otras sustancias que deben acceder al tejido nervioso tienen que pasar obligadamente a través de los citoplasmas endoteliales por medio de algún mecanismo de transporte de membrana, como la difusión facilitada de la glucosa y de los aminoácidos. Esto es importante desde el punto de vista farmacológico, ya que hay drogas que acceden a las neuronas y otras que quedan retenidas por las uniones oclusivas de la barrera. Algunos antibióticos, entre otros muchos ejemplos, no pasan la barrera y son ineficaces para tratar infecciones cerebrales.

Además de la barrera hematoencefálica, se han descrito otras en diferentes órganos, como la *hematotímica*, la *hematobiliar*, la *hematotesticular* o la *hematoocular*.

Otra función importante de las uniones oclusivas es la de *contribuir significativamente a establecer y mantener la polaridad de los epitelios*. Las células

epiteliales polarizadas transportan agua, iones y otras moléculas de un compartimiento biológico a otro (fig. 6-5). Por ejemplo, los enterocitos que recubren la cavidad interna del intestino delgado absorben selectivamente los nutrientes y otros materiales desde la luz del órgano y los transportan por el citosol hacia la superficie basolateral del epitelio, desde donde pasan a través de la lámina basal al tejido conectivo subyacente y al torrente circulatorio.

Esto denota que existen por lo menos dos dominios diferentes de la membrana plasmática. En el *dominio apical* o *superficial*, en contacto con el contenido intestinal, se localizan las proteínas especializadas en la absorción, mientras que en el *dominio basal* o *lateral* se hallan permeasas que permiten la salida de glucosa, la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$, moléculas de adhesión celular y muchas otras que están ausentes en la región superficial. Dado que,

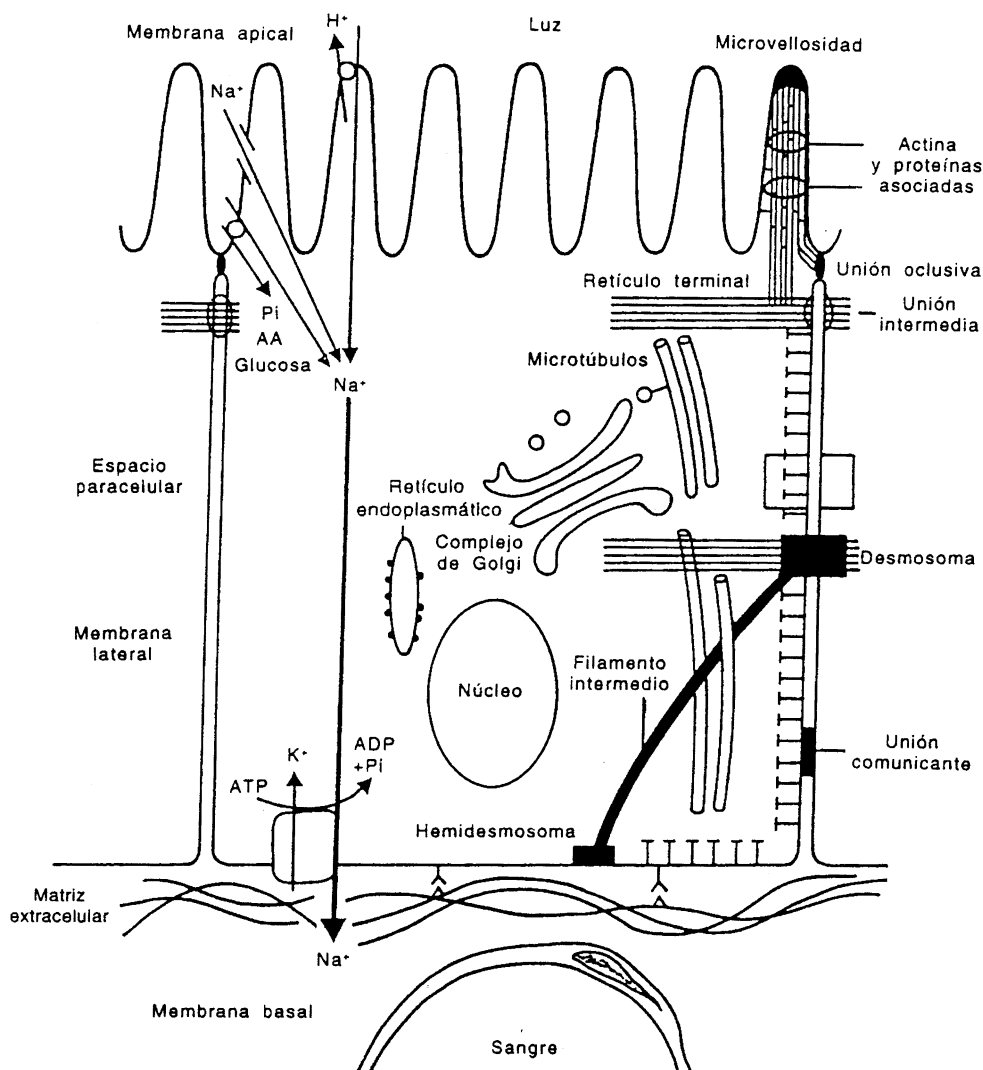


FIG. 6-5. Componentes celulares y procesos involucrados en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad en el epitelio del túbulo renal proximal. A lo largo de las caras laterales se encuentran las uniones intercelulares estructuradas y las moléculas de adhesión celular (CAMs). La ubicación de los tres componentes principales del citoesqueleto es característica de cada uno de ellos: la actina forma el núcleo estructural de las microvellosidades y el retículo terminal que se asocia con las bandas de adhesión; los filamentos intermedios interconectan mecánicamente a las células a nivel de los desmosomas puntiformes, y a las células con la matriz extracelular en los hemidesmosomas; los microtúbulos se extienden desde el centrosoma supranuclear (en relación con el aparato de Golgi) hacia las superficies apical y basal. Las uniones intercelulares oclusivas son fundamentales para la separación de los compartimientos extracelulares luminal y basolateral y para la delimitación y aislamiento de los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática. Las proteínas del dominio apical son responsables del pasaje de sodio a favor de gradiente, que provee la energía necesaria para la excreción de protones y para el simporte de glucosa y aminoácidos. En el dominio basolateral de la membrana, en cambio, se localiza la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ que extrae sodio de la célula. (De E. M. Fish y B. A. Molitoris [1994].)

como vimos en el capítulo 4, el mosaico fluido de las membranas permite una considerable difusión de moléculas en el plano de aquéllas, debe haber mecanismos que restrinjan esos movimientos e impidan el desplazamiento de un dominio especializado a otro. Al tratar el esqueleto membranoso, vimos que proteínas como la ancrina, la fodrina y otras restringen los movimientos laterales en el plano bilipídico (fig. 4-12). Las uniones oclusivas complementan esa función del esqueleto membranoso, al actuar a modo de barreras contra la difusión de macromoléculas y aun de lípidos en la bicapa, como forma de diferenciar y mantener separadas las porciones apicales de las basolaterales de la membrana celular, cada una de ellas con composición y características fisiológicas especiales.

6-4. Las uniones intercelulares adherentes más firmes son los desmosomas

Como indica la tabla 6-1, las uniones estructuradas que mantienen adheridas a las células entre sí son los *desmosomas en banda* y los *desmosomas puntiformes*; secundariamente contribuyen a la adhesión intercelular pequeñas especializaciones denominadas *puntos adherentes*. Estas uniones se diferencian por su localización, extensión, composición molecular y filamentos citoesqueléticos asociados.

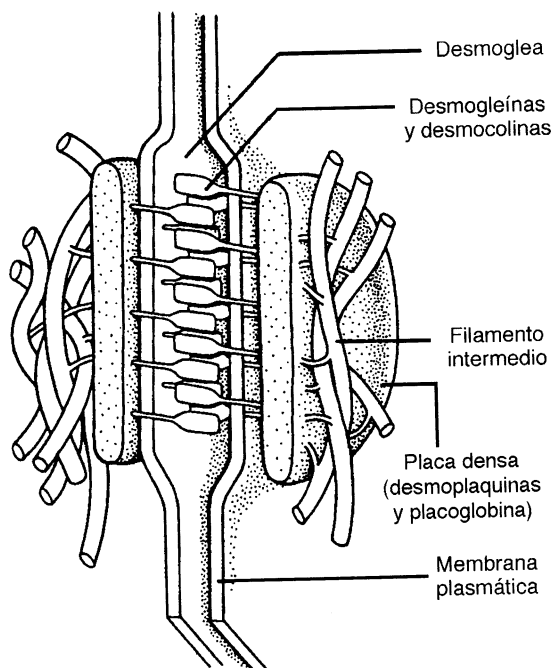


FIG. 6-6. Dibujo de un desmosoma puntiforme. (Véase la descripción en el texto.) (Modificado de L. A. Staehelin y B. Hull [1978].)

1. Desmosoma puntiforme (*macula adherens*). Vistos con el microscopio óptico en preparados coloreados en forma apropiada, como por ejemplo con hematoxilina férrica, los desmosomas puntiformes aparecen como pequeños cuerpos intensamente coloreados en la superficie celular.

El número de desmosomas puntiformes se halla en relación con el grado de tensión mecánica a que está sujeto un tejido. Por ejemplo, el epitelio pavimentoso de la epidermis, que está expuesto a deformaciones y traumatismos continuados, posee numerosos desmosomas.

El microscopio electrónico revela que los desmosomas puntiformes son áreas focales circulares de adhesión, de alrededor de 0,5 μm de diámetro (fig. 6-1), en las que las membranas plasmáticas de dos células adyacentes se hallan separadas por una distancia de 30 a 50 nm, con un material en el espacio intercelular que a veces forma una línea media densa y continua, que recibió el nombre de *desmoglea* y que corresponde al conjunto de moléculas transmembranas de adhesión de la familia de las *cadherinas*.

Las dos membranas plasmáticas desmosómicas adyacentes son perfectamente paralelas, y por dentro de ellas (en el lado citosólico) existe una placa intracelular discoide hacia la que convergen numerosos filamentos intermedios (fig. 6-6). Estos filamentos describen una especie de lazo formando un ancho arco y luego vuelven hacia la célula. Dada la consistencia líquida de las membranas plasmáticas, se comprende que en las uniones adherentes aquéllas deban estar reforzadas mecánicamente por estructuras sólidas, unidas a su vez a los elementos más resistentes del citoesqueleto (los filamentos intermedios).

Analizaremos los diferentes componentes moleculares de los desmosomas puntiformes.

Glucoproteínas transmembranas de adhesión desmosómicas. Están representadas por algunos de los miembros de una superfamilia de moléculas de adhesión denominadas *cadherinas*. Los dominios extracelulares de estas proteínas transmembranas se unen, en forma *homotípica* y *dependiente del calcio*, con los dominios equivalentes de las cadherinas de las células vecinas y proporcionan la base molecular de la adhesión desmosómica. Adhesión homotípica significa que se relacionan entre sí moléculas del mismo tipo de cadherina pertenecientes a células adyacentes. El dominio intramembranoso de las cadherinas recorre el espesor de la bicapa lipídica y se continúa con el dominio citosólico, donde aparentemente se relaciona en forma estrecha con los componentes de la placa densa y el citoesqueleto.

De la superfamilia de las cadherinas se desprenden dos grupos de proteínas de adhesión que in-

tervienen en los desmosomas puntiformes: las desmogleínas (DSG) y las desmocollinas (DG).

La *desmogleína 1* es un polipéptido de 160 kDa que se localizó en los desmosomas de todos los tipos celulares estudiados, por lo cual se considera que es la proteína característica de los desmosomas. Los pacientes afectados de pénfigo foliáceo poseen autoanticuerpos dirigidos contra este polipéptido.

La *desmogleína 3* sólo se expresa en los estratos medios de los epitelios planos estratificados, y los pacientes que desarrollan anticuerpos circulantes contra esta molécula son afectados por el pénfigo vulgar.

Las *desmocollinas* humanas son las DG II, DG III, DG IV y DG V. No se conocen con certeza enfermedades humanas producidas por alteraciones de las desmocollinas, aunque se sospecha que éstas podrían hallarse involucradas en algunas formas de pénfigo.

Proteínas de la placa intracelular desmosómica.

Las *desmoplaquinas I y II* son proteínas de la placa densa submembranosa de los desmosomas, la que suele estar dividida en una porción rígida primaria, adosada a la membrana, y una placa secundaria algo más alejada. Todos los desmosomas poseen desmoplaquina I, mientras que la desmoplaquina II se encuentra en los desmosomas de los epitelios planos estratificados. Tendrían la función de conectar al citoesqueleto de filamentos intermedios con la superficie celular a nivel de las uniones. Se sospecha que en el pénfigoide ampollar y en el pénfigo paraneoplásico podrían existir anticuerpos circulantes contra estas proteínas.

La *placoglobina* de la porción externa de la placa se une firmemente a las cadherinas. La *desmoiquina*, la *desmocalmina* y el *polipéptido de la banda 6* son proteínas menos abundantes.

Filamentos intermedios. Como vimos en el capítulo 5, son los elementos del citoesqueleto más resistentes a las tensiones. Si bien la adhesión celular a nivel del desmosoma depende principalmente de las glucoproteínas transmembranosas (desmogleínas y desmocollinas), los filamentos intermedios proporcionan el sostén mecánico intracelular, al formar un armazón estructural para el citoplasma que interconecta entre sí a todos los desmosomas de la célula. Manojos de estos filamentos, que provienen de las profundidades del citoplasma y de otros desmosomas, penetran en la placa densa, hacen un bucle en ella y vuelven hacia el citoplasma o hacia otros desmosomas. A nivel de la placa existe una proteína, la *plectina*, que parece unir a los filamentos.

En el caso de los desmosomas de los epitelios, que son los más frecuentes, los filamentos intermedios involucrados son los de citoqueratinas de di-

ferentes tipos. Cabe recordar, sin embargo, que existen desmosomas puntiformes en muchos otros tejidos, y en ellos el tipo de filamentos intermedios desmosómicos será el correspondiente a cada clase de célula. Por ejemplo, los desmosomas puntiformes entre las prolongaciones de los astrocitos poseen filamentos intermedios de GFAP, mientras que los de los discos intercalares de los cardiocitos son de desmina.

2. Bandas de adhesión (*zonula adherens*, unión intermedia, desmosoma en cinturón o desmosoma en banda). El término "desmosoma en banda" que se utilizó para denominar a esta unión es equívoco, ya que existen importantes diferencias entre ella y los verdaderos desmosomas (los puntiformes). Una de las principales reside en que los filamentos citoesqueléticos asociados a las bandas de adhesión están constituidos por actina, mientras que los de los desmosomas puntiformes, como ya vimos, son filamentos intermedios. Los tipos de cadherinas y los componentes moleculares de las placas también son diferentes. Funcionalmente existen asimismo diferencias entre ambas estructuras.

En cuanto a la forma, dijimos que los desmosomas puntiformes son pequeñas zonas discoidales que unen las células a modo de puntos de soldadura o remaches. Las bandas de adhesión, por el contrario, forman una franja o anillo que une a las células adyacentes algo por debajo de la superficie epitelial, inmediatamente después de las uniones oclusivas.

Analizaremos los diferentes componentes moleculares de las bandas adherentes o uniones intermedias.

Glucoproteínas transmembranosas de adhesión.

Como en el caso de los desmosomas puntiformes, las moléculas de adhesión de los desmosomas en banda son miembros de la superfamilia de las cadherinas. Las que componen este tipo de uniones fueron las primeras en ser descritas, por lo que a veces se las denomina *cadherinas tradicionales*. Existen diferentes cadherinas que tienen localizaciones especiales y sus nombres reflejan esa característica: se reconocen grupos de cadherinas E (epiteliales), P (placentarias y de piel) y N (neuroepiteliales). Todas tienen dominios extracelulares que se unen específicamente, en forma homotípica y dependiente del calcio, a cadherinas idénticas de células vecinas. Los dominios citosólicos se relacionan firmemente con proteínas intracelulares que se conectan con los microfilamentos de actina.

Proteínas intracelulares de conexión y microfilamentos. En el interior de cada célula se encuentra un manojo de microfilamentos paralelos de actina, que corren circularmente alrededor del contorno celular en relación con la banda de adhesión y que se conectan con los dominios cito-

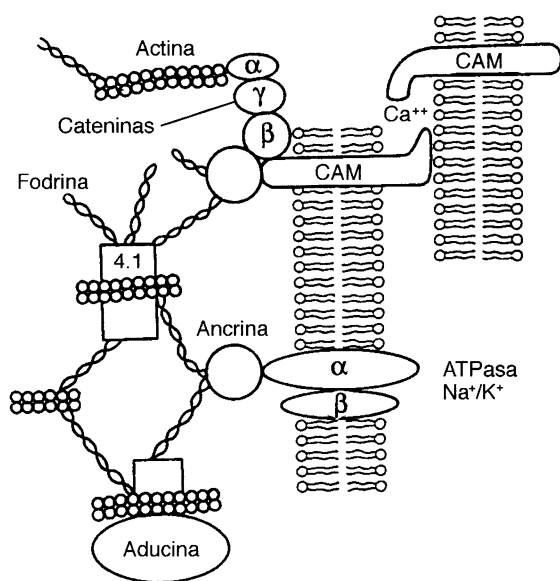


FIG. 6-7. Esquema de una región del dominio lateral de la membrana plasmática de una célula del epitelio del túbulo proximal renal similar a la ilustrada en la figura 6-5. El esqueleto de membrana (cap. 4) se une a las diferentes proteínas de membrana y las inmoviliza en sus respectivos dominios. En este caso la ancrina se une a la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y a las moléculas de adhesión celular.

sólicos de las cadherinas por medio de proteínas de conexión. Estas últimas comprenden principalmente las cateninas —de las cuales existen por lo menos tres formas—, la vinculina, la α -actinina y otras (fig. 6-7).

En la sección 6-1 analizamos las características del *retículo terminal*. Esta estructura se ubica a la altura del cinturón de microfilamentos de la banda de adhesión, y sus componentes de actina y filamentos intermedios contribuyen a la estructura y función de estas uniones.

Dado que los microfilamentos de actina interactúan con proteínas motoras del tipo de la miosina II, ejercen cierta tensión en la zona de uniones continuas de las láminas epiteliales. En ciertos casos esta fuerza es suficiente para producir el cambio de la forma celular, particularmente en la transformación de parte de una lámina epitelial en un surco y finalmente en un tubo (fig. 6-8). Estas uniones son especialmente importantes durante la embriogénesis, cuando los tejidos experimentan drásticos cambios morfológicos y funcionales que se relacionan en parte con la expresión diferencial de distintas cadherinas.

3. **Punto adherente (*punctum adherens*).** En muchas células de prácticamente todos los tipos de tejidos existen pequeñas áreas de membrana identificables solamente con el microscopio electrónico que muestran algunas de las características de los

desmosomas puntiformes, pero tienen un tamaño mucho menor, parecen menos organizadas estructuralmente y no poseen filamentos intermedios sino que a ellas parecen convergir microfilamentos de actina. Probablemente actúen como sitios focales de unión intercelular, y para diferenciarlas de los desmosomas verdaderos se propuso el término de *puntos adherentes*. Sus componentes moleculares no están bien caracterizados.

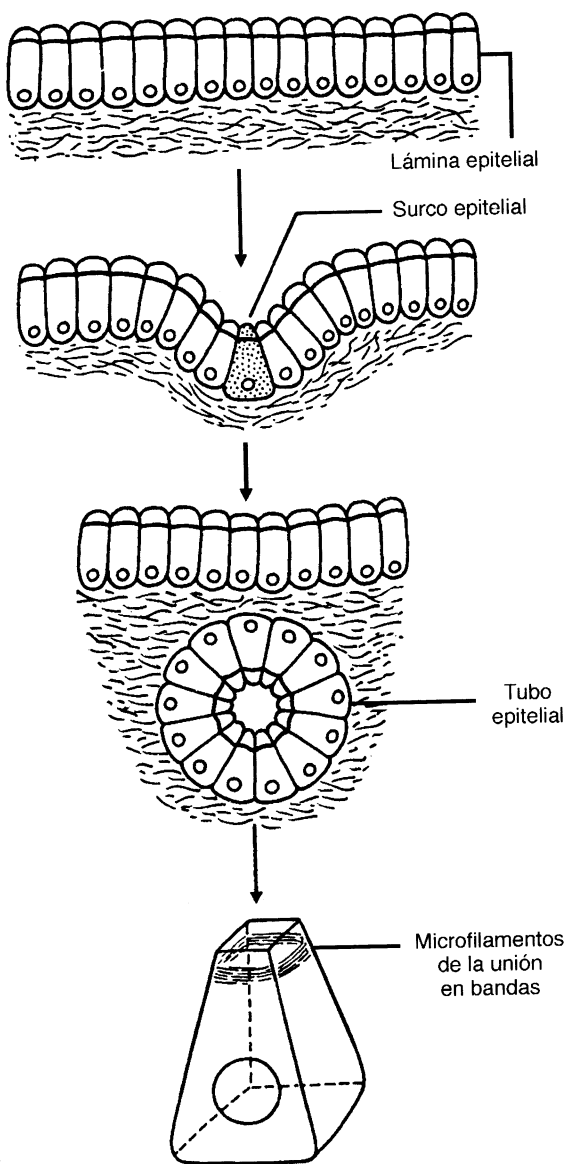


FIG. 6-8. Esquema que ilustra la invaginación de una lámina epitelial hacia el mesénquima para formar un surco y por último un tubo por contracción de los microfilamentos asociados a las bandas de adhesión o desmosomas en banda. La célula grisada se representa en la parte inferior para evidenciar su forma piramidal truncada.

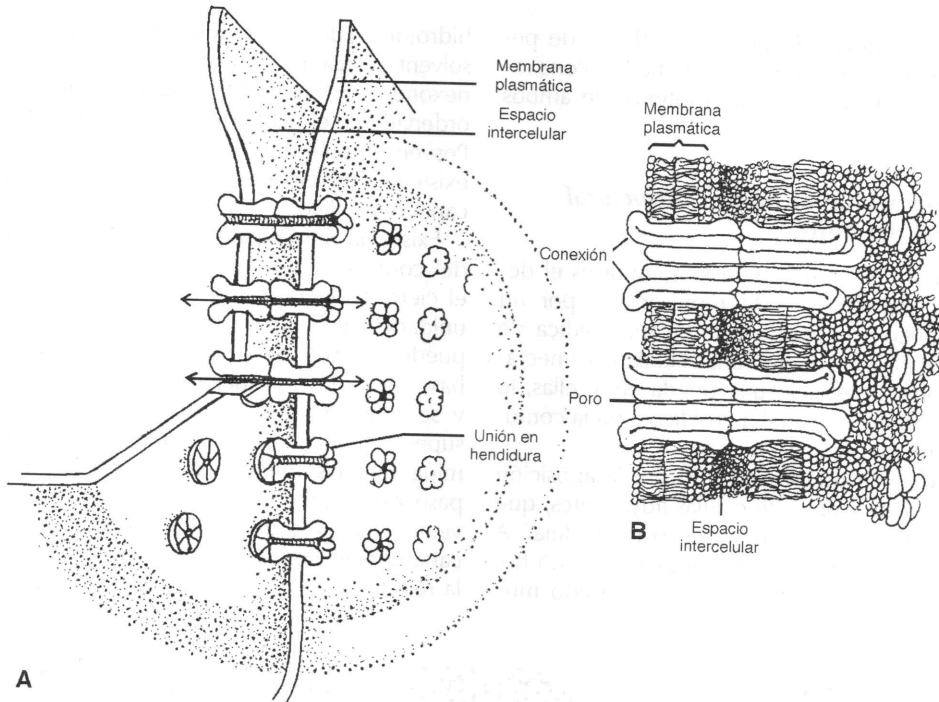


FIG. 6-9. A. Esquema de una unión comunicante entre dos células. Los canales están formados por partículas presentes en cada membrana que atraviesan el espacio intercelular. El flujo de líquido entre las células está indicado con flechas. (Copiado de A. Staehelin y B. Hull, 1978.) B. Estructura más fina del conexón o unidad funcional. El canal tiene un poro de aproximadamente 2 nm y está formado por dos hexámeros (seis subunidades cada uno) que atraviesan la bicapa lipídica. (Copiado de Makoski et al. [1977]; cortesía de W. R. Loewenstein.)

4. **Uniones septadas.** Estas diferenciaciones son exclusivas de los invertebrados. Son anchas bandas circunferenciales que rodean los bordes de las células adyacentes, inmediatamente por debajo de la superficie epitelial. Las membranas celulares son paralelas, separadas por un espacio extracelular de unos 18 nm, que es atravesado a intervalos regulares por unas barras electrodensas que le dan en las microfotografías electrónicas un aspecto característico de escalera de mano.

Se sugirió para estas uniones una función oclusiva del tipo de la que posee la *zonula occludens*, pero la abundancia de microfilamentos de actina con los que se vinculan podría denotar también una función adherente del tipo de la *zonula adherens*.

6-5. Las uniones comunicantes o nexos acoplan funcionalmente a las células

El concepto de que la célula es la unidad de materia viviente no debe dejar de lado el hecho de que los organismos multicelulares están constituidos por poblaciones celulares capaces de interactuar entre sí. Esta interacción celular es esencial para la coordinación de actividades; además, durante el desarrollo son necesarias para la propagación de señales que controlen el crecimiento y la diferenciación. Actualmente se sabe que en un te-

jido organizado la mayoría de las células están interconectadas por canales de unión y que comparten una fuente común de pequeños metabolitos y iones, los cuales pueden pasar libremente de una célula a otra. Sin embargo, su individualidad se mantiene porque las macromoléculas, incluidas las que llevan información genética (ADN y ARN), no se intercambian. Estas interconexiones celulares están dadas por la presencia de las llamadas *uniones comunicantes* o *nexos*. Los primeros estudios de las uniones intercelulares efectuados con el microscopio electrónico pasaron por alto a los nexos, que fueron interpretados erróneamente como zonas de fusión pentalaminar de membranas e incluidos dentro de las uniones oclusivas o estrechas. Más tarde, estudios cuidadosos y el empleo de trazadores electrodensos para el relleno de los espacios intercelulares demostraron que a nivel de estas uniones existe siempre un espacio extracelular de unos 20 nm. Se les dio entonces el nombre de *gap junctions* en inglés, o *uniones con espacio* o *con hendidura*. *Nexo* (*nexus*) es otro de sus nombres, que destaca su papel de conectar funcionalmente a las células. En la actualidad se utiliza el término descriptivo de *unión comunicante*.

La unión con hendidura aparece como un contacto en forma de placa redondeada, en la cual las células adyacentes se hallan separadas por un es-

pacio que es atravesado por una multitud de pequeños canales proteicos, denominados *conexones*, que comunican entre sí el interior de ambos citoplasmas (fig. 6-9, A).

6-6. El conexón es la unidad estructural y funcional del nexo

La unidad de la unión con hendidura es el denominado *conexón*, y está representada por un tubo cilíndrico que atraviesa la bicapa lipídica de cada una de las dos membranas celulares conectadas, así como el espacio que queda entre ellas, lo cual proporciona un canal hidrofílico para la comunicación intercelular (fig. 6-9, B).

Cada conexón está constituido por la aposición de dos hemiconexones de células adyacentes, que se acoplan en la mitad del espacio intercelular. A su vez, cada uno de los hemiconexones es un hexámero de *conexina*, que es un polipéptido muy

hidrofóbico de 26 kDa, que puede ser extraído con solventes orgánicos como un proteolípido. Los conexones se disponen de manera apretada y muy ordenada en el plano de las membranas (fig. 6-10). Poseen un diámetro de unos 8 nm, y en su centro existe un orificio de 1,5 nm que corresponde al canal hidrofílico.

Existe un mecanismo para la apertura y el cierre del conexón. Como se muestra en la figura 6-11, el cierre se logra por el deslizamiento de las subunidades, una contra la otra. En el esquema se puede observar que, mediante una rotación en la base, disminuye la inclinación de las subunidades y se produce el cierre en la cara citoplasmática superior. Este mecanismo podría ser el que determina que las uniones con hendidura regulen el paso de pequeñas moléculas entre las células vivientes. El agregado de Ca^{2+} produce el cierre del canal por el desplazamiento de las subunidades y la reducción de su inclinación de 14° a 5° .

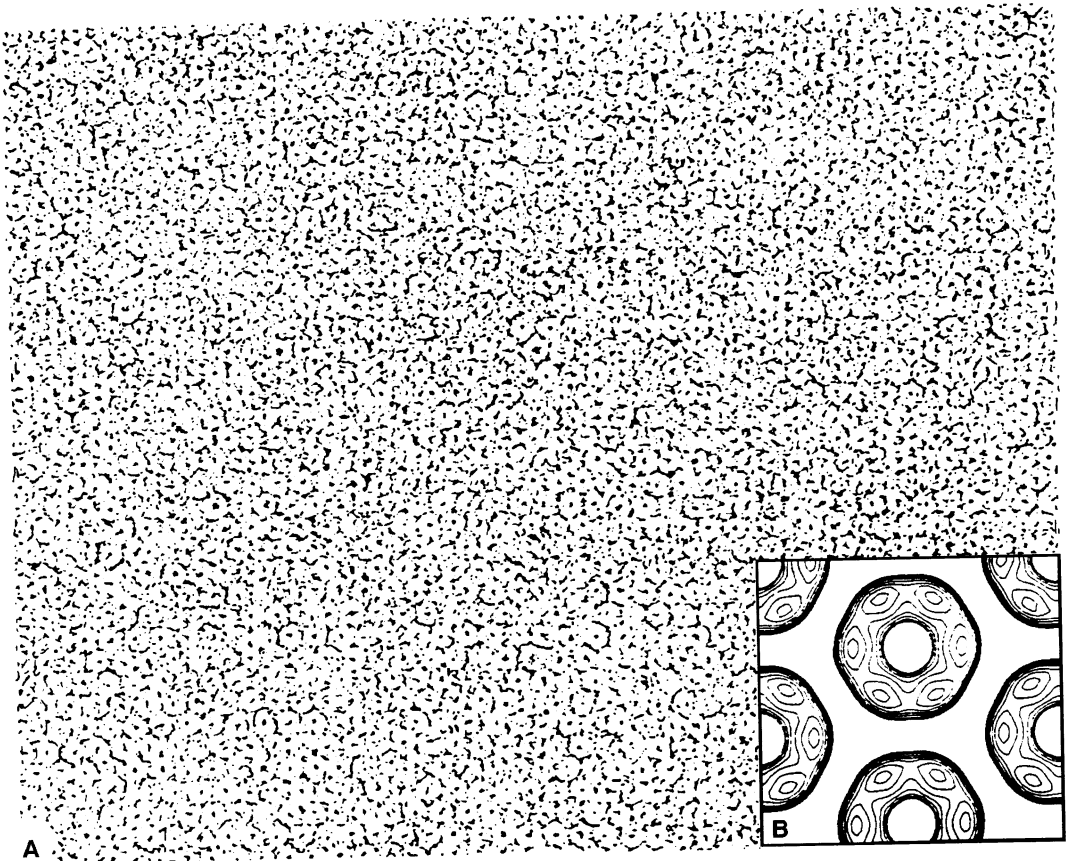


FIG. 6-10. A. Vista superficial de una unión comunicante aislada de la membrana del hepatocito de rata, con coloración negativa con acetato de uranilo. Obsérvese que cada unidad morfológica y funcional (conexón) tiene forma de anillo con un punto coloreado en el centro. $425.000\times$. B. Mapa de proyección hecho por procesamiento en computadora de las fases y amplitudes de una parte de A. Las dimensiones del conexón son de $8,5 \times 8,5$ nm. Cada uno está constituido por seis subunidades proteicas idénticas que rodean a un canal hidrofílico. (Cortesía de G. Zampighi.)

Este cierre de los conexones mediado por el aumento de la concentración de calcio es de suma importancia, si se recuerda que el Ca^{2+} está concentrado casi 4.000 veces menos en el interior de la célula que en el exterior. La muerte de una célula implica la destrucción de su membrana celular, con la consiguiente irrupción de calcio y de otros iones al citoplasma, desde donde podrían pasar rápidamente —con consecuencias desastrosas— a las células vecinas conectadas por nexos. En estas condiciones el aumento de la concentración de calcio cierra los canales, que pueden volver a abrirse si el calcio es removido.

El mecanismo de cierre también depende del potencial de membrana, puesto que la despolarización de la membrana cierra el canal. Esta observación sugiere que debe existir un dipolo, sensible al campo eléctrico, asociado con el canal. Sin embargo, esta dependencia del voltaje no se encuentra en todas las células.

Se ha estudiado el desarrollo de estas uniones en varias células. Consiste en la aparición de placas entre las células, reducción del espacio intercelular, partículas precursoras de mayor tamaño y, finalmente, su disposición en arreglos poligonales.

Cuando dos células se ponen en contacto, la comunicación puede producirse en pocos segundos y no requiere nueva síntesis de proteínas. Por este motivo se piensa que las partículas de 8 nm se encuentran presentes en la superficie celular como protocanales y que pueden difundir e interactuar con partículas semejantes en la otra membrana.

En la formación de la unión con hendidura o nexo el AMP cíclico puede desempeñar un papel importante. Cuando se incrementa la concentración de este nucleótido aumenta el número de canales. En las células de neuroblastoma el aumento de AMPc y de canales puede ser mediado por catecolaminas que actúan sobre un receptor. La regulación por AMPc parece ser mediada por una proteína quinasa.

Permeabilidad a iones y moléculas pequeñas.

El calibre de los conexones se ha estimado por: a) microscopía electrónica; b) mediciones eléctricas, y c) difusión de sustancias trazadoras desde un citoplasma a otro. Por el estudio de la conductancia de los canales y la resistencia del citoplasma es posible calcular el diámetro en alrededor de 1 nm, lo que coincide con las observaciones morfológicas.

El primer trazador utilizado para evidenciar la permeabilidad de los conexones fue la fluoresceína (300 Da), que microinyectada en una célula difunde luego a las vecinas. Se han usado también diferentes péptidos y se ha llegado a un límite máximo para el pasaje de 1.300 a 1.900 Da, lo que corresponde a un canal de 1,4 nm.

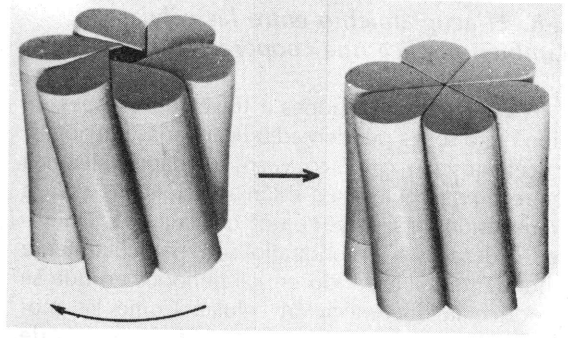


FIG. 6-11. Modelo en madera del conexon, que muestra la transición de la configuración "abierta" a la "cerrada", como lo sugieren los mapas de la figura 6-10, B. Se ha postulado que el cierre en la cara citoplasmática (superior) se obtiene por el deslizamiento de las subunidades unas contra otras, que hace que éstas disminuyan su inclinación y, en consecuencia, experimenten una rotación en sentido horario en la base. El sombreado algo más oscuro en el costado del modelo indica la porción que quedaría incluida en la membrana. (Cortesía de N. Unwin y G. Zampighi.)

6-7. El acoplamiento eléctrico entre las células depende de las uniones con hendidura

Una de las manifestaciones de la interacción celular es el acoplamiento eléctrico. Mediante la implantación de microelectrodos dentro de células adyacentes de un tejido puede demostrarse que existen comunicaciones entre gran número de células animales. Las células están eléctricamente acopladas o, dicho de otra manera, tienen regiones de baja resistencia por las cuales fluye con bastante libertad una corriente eléctrica transportada por iones. Las otras partes de la membrana celular, que no están acopladas, presentan una resistencia mayor. Este tipo de acoplamiento, denominado comunicación a través de uniones, está ampliamente difundido. En el adulto las únicas células que no poseen estas uniones comunicantes son las libres —como los leucocitos en la sangre—, la mayor parte de las neuronas y las células musculares esqueléticas.

El acoplamiento eléctrico depende de las uniones con hendidura o nexos. Esta propiedad es fundamental en la contracción cardíaca, en la que el potencial de acción es transmitido de un cardiocito a otro por acoplamiento eléctrico a nivel de los nexos que forman parte de sus discos intercalares.

En las neuronas existen dos tipos de comunicación o sinapsis: una es relativamente lenta (la sinapsis química) y la otra es mucho más rápida (sinapsis eléctrica). En esta última, presente en algunas neuronas que intervienen por ejemplo en las reacciones de huida de los insectos, la base del acoplamiento eléctrico también son los nexos.

6-8. El acoplamiento entre las células también implica una cooperación metabólica

A estas comunicaciones a través de uniones de tipo nexos se les pueden adjudicar varias funciones. En el músculo cardíaco y en la sinapsis eléctrica entre ciertas neuronas, están relacionadas con la transmisión de señales de una célula a otra. Durante el desarrollo embrionario son particularmente abundantes, sobre todo en los períodos en que se produce la diferenciación celular. Como las moléculas pueden difundir con facilidad a través de ellas, constituyen un medio excelente para la disseminación de señales que controlan el crecimiento y la diferenciación celulares dentro de un radio pequeño.

El acoplamiento entre las células no solo es eléctrico sino también metabólico, ya que las uniones nexos permiten el paso de iones y pequeñas moléculas como nucleótidos, azúcares, aminoácidos, vitaminas y otros metabolitos. Este intercambio da origen a la llamada *cooperación metabólica intercelular*. La figura 6-12 muestra un experimento de transferencia de nucleótidos entre células en cultivo.

En casi todos los tejidos las células están acopladas y muestran una cooperación metabólica que produce un control coordinado de sus actividades. Al mismo tiempo, cada una de las diferentes células que integran un tejido retiene su espectro característico de macromoléculas. El resultado es que el conjunto del tejido tiene propiedades que difieren de las de cada una de sus células componentes.

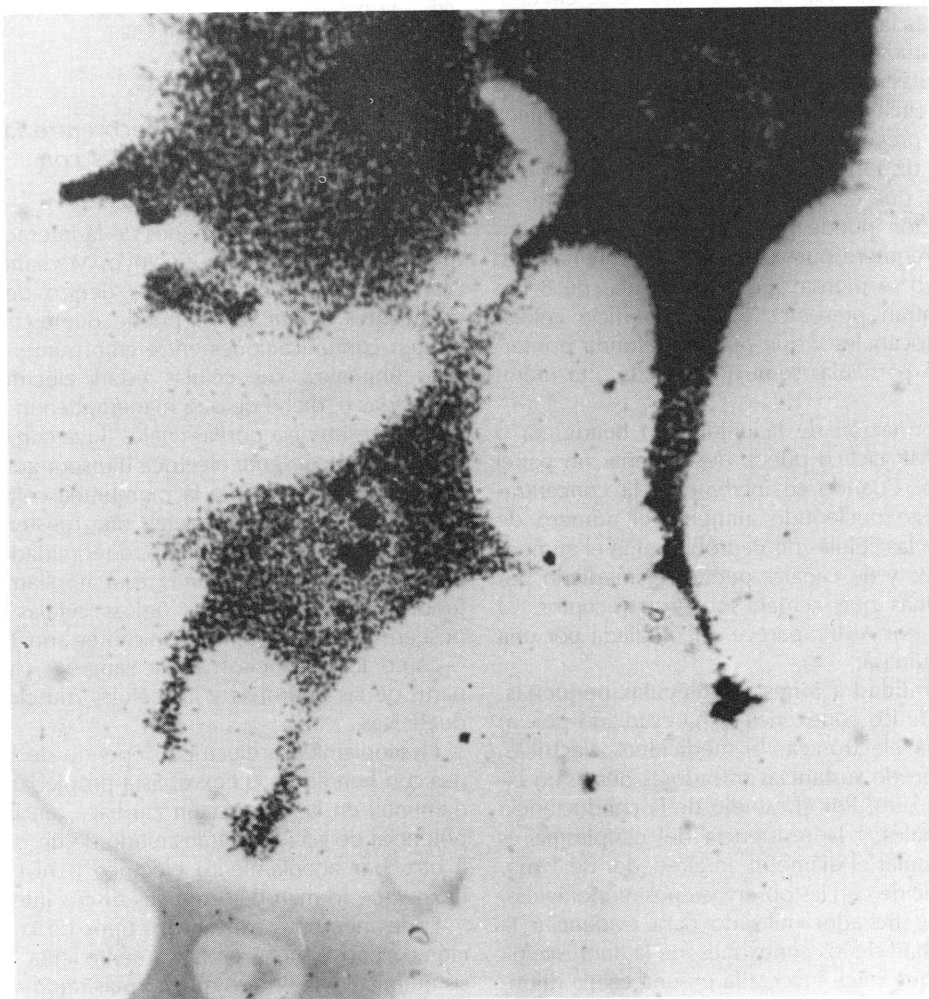


FIG. 6-12. Experimento que ilustra la cooperación metabólica. Se marcaron con uridina- ^3H células BHK cultivadas y luego se agregaron células no marcadas. En la radioautografía se observa que de la célula original fuertemente marcada (arriba a la derecha) la uridina se transfiere a dos células que hacen contacto directo, pero no a otra que no está en contacto (abajo, a la izquierda). 1.160 $\times$. (Cortesía de J. D. Pitts.)

6-9. En las células cancerosas el acoplamiento puede estar alterado

Es sumamente interesante la ausencia de acoplamiento entre células cancerosas y su incapacidad para comunicarse con células normales (fig. 6-13). Se presume que aquéllas tienen un defecto genético que interrumpe el paso de las moléculas que controlan el crecimiento. Se ha logrado obtener un híbrido no canceroso mediante la producción de heterocariones —es decir, fusión celular— formados por una célula cancerosa y otra normal. Las comunicaciones intercelulares ausentes en la célula cancerosa original se restablecieron, sin embargo, en los híbridos.

También se hicieron hibridaciones entre los fibroblastos humanos normales y células cancerosas de ratón que originalmente no presentaban comunicación intercelular. Se ha encontrado que hay un factor humano, probablemente ligado a un cromosoma, que sería capaz de corregir el crecimiento y el defecto de comunicación de la célula cancerosa.

Estos y otros experimentos sugieren que el acople y el desacople podrían estar determinados genéticamente. Señalan también el posible papel regulador de algunas moléculas de bajo peso molecular, probablemente nucleótidos, que al pasar de una célula a otra controlarían el crecimiento y la diferenciación. Dichos agentes reguladores no son transferidos a las células cancerosas que no tienen comunicación intercelular.

Es evidente que la mayoría de las células, como la sociedad humana, necesitan un intercambio de información para mantener una salud normal.

INTERACCIONES DE LAS CELULAS ENTRE SI Y CON LAS MATRICES EXTRACELULARES

En los organismos multicelulares, la mayor parte de sus funciones resultan de la interacción coordinada de sus células entre sí y de las células con las matrices extracelulares que las rodean. Esto implica la existencia de complejos mecanismos de reconocimiento, adhesión, comunicación y regulación que son llevados a cabo por medio de moléculas de las membranas plasmáticas.

Entre esas moléculas existe un grupo de glucoproteínas transmembranosas conocidas como *moléculas de adhesión celular* (CAMs). Comprenden varias familias, que incluyen a las *cadherinas*, *integrinas*, *selectinas* y otras que iremos analizando. A diferencia de las uniones intercelulares estructuradas que vimos más arriba, las interacciones de la mayor parte de las CAMs entre sí y con las moléculas de las matrices extracelulares se efectúan a nivel submicroscópico.

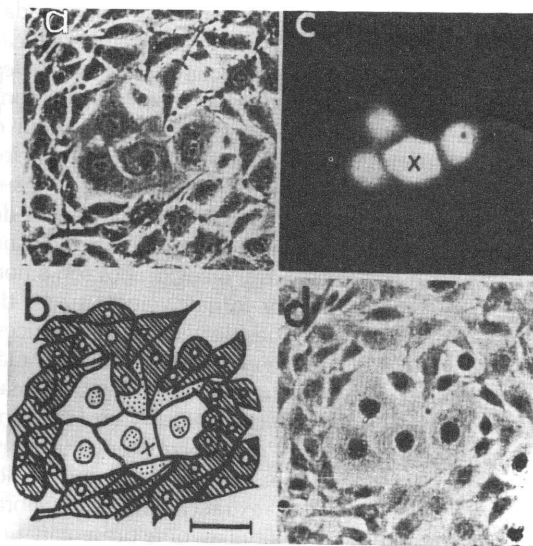


FIG. 6-13. Experimento que demuestra la falta de acoplamiento entre células normales y cancerosas. **a.** Micrografía de contraste de fases de un cultivo donde hay cuatro células hepáticas normales rodeadas de células cancerosas (véase el esquema en **b**). **c.** En la célula marcada con **x** se efectuó una inyección de fluoresceína, y se observa que el colorante difundió hacia las otras tres células normales, pero no hacia las cancerosas. Como la fluoresceína estaba marcada con tritio, después de la radioautografía (**d**) sólo se aprecia la marca en las cuatro células normales. (De R. Azarnia y W. R. Loewenstein [1971].)

6-10. Las matrices extracelulares poseen proteínas y proteoglicanos situados por fuera de la membrana plasmática

Las matrices extracelulares (MEC) están constituidas por una serie de proteínas y proteoglicanos localizados por fuera de las membranas plasmáticas y que son producidos y secretados por las células. Ciertos tejidos, como los conectivos y sus derivados, son especialmente ricos en MECs. En otros, como los epitelios o el tejido nervioso, representan un componente cuantitativamente menor, pero no por eso menos importante en sus funciones. Pese a que la mayor parte de las células están rodeadas por algún tipo de MEC, como la cápsula de las bacterias o la celulosa de los vegetales, nuestra descripción pondrá énfasis en las MECs de los animales superiores.

Los principales componentes macromoleculares de las matrices extracelulares son: 1) los proteoglicanos; 2) las proteínas estructurales (principalmente el colágeno), y 3) las proteínas de adhesión (como laminina y fibronectina, entre otras), que interactúan con algunas de las CAMs y con las proteínas estructurales.

Proteoglucanos. Están constituidos por variadas proteínas asociadas a diversos *glucosaminoglucanos* (GAGs). Estos son polisacáridos en los cuales existe una unidad de disacárido repetitiva que contiene un aminoazúcar (sea N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina). En la tabla 6-2 se mencionan los principales glucosaminoglucanos con sus unidades repetitivas. A causa de la presencia de grupos carboxilo y sulfato, estos polisacáridos son moléculas muy ácidas. Los proteoglucanos son amorfos y se caracterizan por formar geles capaces de retener grandes cantidades de agua en las matrices.

Colágeno. Representa el grupo de proteínas más abundante que se encuentra en el reino animal. Además de formar una capa amorfa en la lámina basal de ciertos tejidos, más frecuentemente constituye las fibras colágenas y reticulares que se localizan en los espacios extracelulares. Estas fibras están compuestas por fibrillas que presentan una estriación característica, con una periodicidad de 67 nm en estado nativo; sirven de sostén mecánico

para el tejido y representan superficies sobre las cuales pueden deslizarse las células.

El colágeno es sintetizado por las células de origen mesenquimático y por casi todas las epiteliales

TABLA 6-2. Principales glucosaminoglucanos y su unidad de disacárido repetitiva

Glucosaminoglucano	Unidad de disacárido
Acido hialurónico	Acido D-glucurónico N-acetil-D-glucosamina
Condroitina	Acido D-glucurónico N-acetil-D-galactosamina
Condroitín sulfato A	Acido D-glucurónico N-acetil-D-galactosamina 4-sulfato
Dermatán sulfato	Acido L-idurónico N-acetil-D-galactosamina 4-sulfato
Queratán sulfato	D-galactosa N-acetil-D-glucosamina 6 sulfato

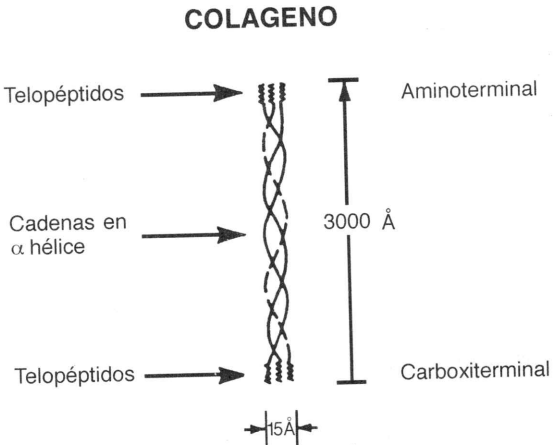
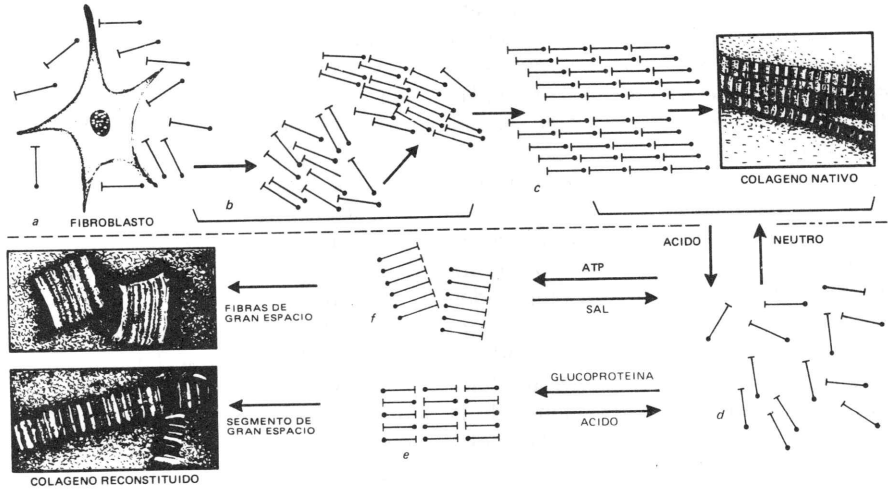


FIG. 6-14. Esquema de la formación y reconstrucción del colágeno. Un fibroblasto (a) fabrica moléculas de procolágeno (b), que forma colágeno nativo (c). Las fibrillas de colágeno se solubilizan en ácido (d) y el colágeno resultante, en presencia de glucoproteínas, produce fibras con espacios largos (e) y, con el agregado de ATP, colágeno en segmentos de espacio largo (f). Los espacios largos de 280 nm son consecuencia de la agregación lateral de las moléculas de colágeno sin superposición. El espacio de 70 nm de colágeno nativo se debe a la superposición de la molécula. (Cortesía de J. Gross.) En la parte superior se representa la estructura de una molécula de procolágeno.



de los vertebrados, con pocas excepciones, aunque las células del tejido conectivo son las que lo producen en mayor cantidad.

El colágeno es una molécula alargada de unos 300 nm de longitud y 1,5 nm de ancho (fig. 6-14), compuesta por tres polipéptidos de aproximadamente 95 kDa, enroscados de manera helicoidal. La porción más grande de la molécula tiene una organización en hélice α , con cortos segmentos no helicoidales de 16 a 25 residuos en ambos extremos, denominados telopéptidos. La secuencia de aminoácidos del colágeno es bastante simple: cerca de una tercera parte es glicina, otra tercera parte prolina e hidroxiprolina y el resto contiene los demás aminoácidos.

Sabemos que existen casi veinte tipos de moléculas de colágeno, sobre la base de ligeras diferencias de organización de los polipéptidos, así como de la asociación con otras moléculas. Los más abundantes son los del tipo I al IV. El tipo I se encuentra en los conectivos densos, como la dermis reticular, el hueso, los tendones, la córnea y la dentina; el tipo II se halla principalmente en el cartílago; el tipo III en los conectivos laxos, como los de la dermis papilar, el sistema cardiovascular, el útero y el intestino; el tipo IV en la lámina basal (véase la sección siguiente). Los tipos I, II y III muestran fibrillas estriadas típicas, pero el tipo IV carece de estructura fibrilar definida.

Podemos considerar al colágeno como un monómero macromolecular porque, por interacción, es capaz de formar diferentes estructuras. La molécula de colágeno es polarizada —es decir, tiene una secuencia lineal definida de residuos de aminoácidos en las cadenas intramoleculares— y se comporta como si tuviera una “cabeza” y una “cola” (fig. 6-14). El hallazgo de que el colágeno, en presencia de ATP, produce segmentos cortos de apenas 300 nm de longitud serviría de explicación acerca del probable mecanismo de producción de la periodicidad de 67 nm.

Los segmentos de espaciamiento largo derivan del hecho de que las moléculas de colágeno se agregan en paralelo con todos los aminoácidos en registro. En el caso del colágeno estriado, se cree que existe una superposición en casi una cuarta parte de su longitud (fig. 6-15). Este modelo ha sido ligeramente modificado partiendo del hecho del que el colágeno tiene una longitud igual a 4,4 D (en la cual $D = 67$ nm).

Como se ilustra en la figura 6-15, en cada período D hay una región en agujero de 0,6 D y una región superpuesta de 0,4 D. La coloración negativa penetra más en la región en agujero y produce la banda oscura, pero queda excluida de la región superpuesta. Tanto en los segmentos con espaciamiento largo como en la fibra estriada nativa, las

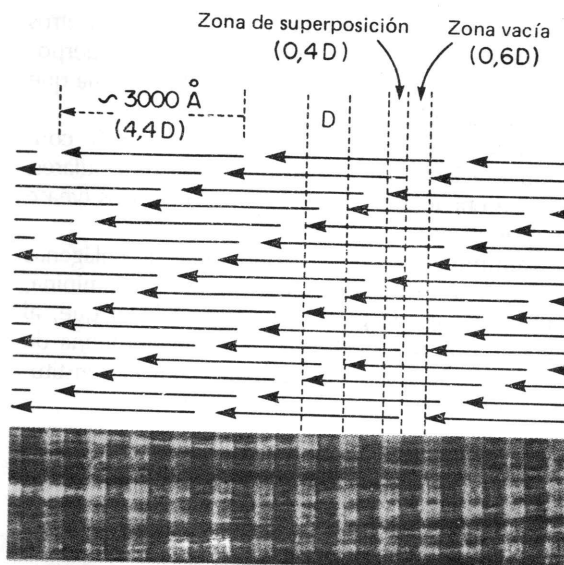


FIG. 6-15. Modelo bidimensional del empaquetamiento de las moléculas de colágeno (flechas) en una fibra nativa. (Véase la descripción en el texto.)

moléculas de colágeno están orientadas en una única dirección. Sin embargo, cuando el colágeno está mezclado con glucoproteína, puede reconstituir fibrillas con espaciamiento largo. En este caso se cree que las moléculas de colágeno están orientadas en ambas direcciones (fig. 6-14).

La síntesis de colágeno y la fibrillogénesis son complejos mecanismos de múltiples etapas que comprenden varios pasos intracelulares y extracelulares. Las interacciones del colágeno a nivel supramolecular comienzan en el interior de la célula y continúan en el espacio extracelular.

Fibronectinas. Comprenden una familia de glucoproteínas diméricas involucradas en las adhesiones célula-matriz y célula-célula, que intervienen en la migración celular, en la organización del citoesqueleto y en la diferenciación celular, así como en la transformación cancerosa.

La fibronectina es una proteína dimérica de 440 kDa en forma de filamento largo, fino y flexible. Sus múltiples isoformas se originan por el procesamiento diferencial de un único transcrito primario, así como por diferentes modificaciones postraduccionales, como glucosidación diferencial en el aparato de Golgi. Posee numerosos sitios de fijación mediante los cuales se une al colágeno, la fibrina, la heparina y otras macromoléculas, como también a proteínas de la membrana celular de la familia de las *integrinas*.

Estudiando la migración de células de las crestas neurales del embrión se ha demostrado que la fibronectina es indispensable. En experimentos *in vitro* se ha visto que estas células prefieren una su-

perficie de vidrio cubierta con fibronectina a otros sustratos. Esa migración es inhibida por anticuerpos contra la región de la molécula de fibronectina que se fija a la célula.

La liberación de fibronectina por la célula contribuye a la formación de matrices extracelulares, que se encuentran en casi todos los tejidos (véase más adelante).

Laminina. Entre las glucoproteínas no colágenas de las matrices una de las principales es la laminina, una molécula de gran tamaño (850 kDa) que, al igual que la fibronectina, es una glucoproteína de adhesión. Será descrita al considerar la constitución molecular de las láminas basales.

6-11. Las láminas basales son matrices extracelulares especializadas

Las láminas basales tienen funciones de sostén, adhesión, filtro y regulación de importantes funciones celulares como el crecimiento y la diferenciación. Son producidas por múltiples tipos de células: epiteliales, endoteliales, musculares, nerviosas y otras.

Si bien pueden existir variaciones en diferentes localizaciones o a lo largo del desarrollo, una lámina basal posee una estructura microscópica típica. Con el microscopio de luz, en general son identificables con métodos inmunohistoquímicos o con el

PAS como una delgada banda asociada a la superficie celular en la base de los epitelios o en otras ubicaciones.

El microscopio electrónico revela una estructura doble, con una *lámina lúcida* o *lámina rara* adyacente a la membrana plasmática y una *lámina densa* más alejada (fig. 6-16).

El *colágeno IV* es el principal componente de la lámina densa; cuando es secretado por las células se autoagrega en una red tridimensional estable que interactúa con los otros componentes de la lámina, como la laminina y los proteoglucanos.

La *laminina*, de la que existen varias isoformas, tiene una estructura bastante peculiar en forma de cruz, con un brazo largo y dos brazos cortos unidos por puentes disulfuro, y contiene una alta cantidad de hidratos de carbono (12 a 15%). Es un componente abundante de todas las láminas basales de los tejidos, en las cuales interactúa con el proteoglucano heparán sulfato. La laminina es la primera proteína de la matriz extracelular que aparece en el embrión y puede detectarse en la etapa de mórula (16 células). En el curso de la embriogénesis influye de modo importante en la adhesión, migración, crecimiento y diferenciación celulares.

En el riñón, esta proteína puede actuar como una barrera a la filtración; los anticuerpos contra la laminina pueden producir depósitos en la membra-

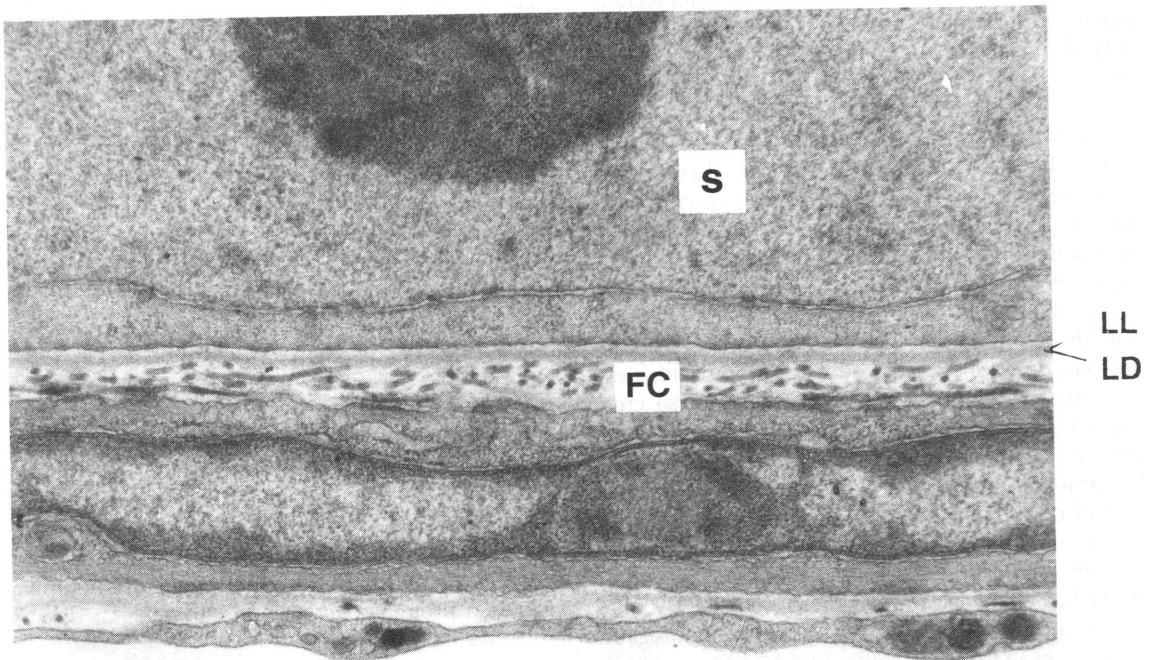


FIG. 6-16. Microfotografía electrónica de la lámina basal del epitelio seminífero de rata. Por debajo de la membrana plasmática de la célula de Sertoli (S) se ve la lámina lúcida o rara (LL) y a continuación la lámina densa (LD). Las fibrillas colágenas (FC) forman la lámina reticular que se asocia a muchas basales. (De R. Ponzio.)

na basal glomerular y afectar gravemente la función renal. La laminina está aumentada en las láminas basales de los individuos diabéticos y se encuentran anticuerpos contra ella en la enfermedad de Chagas.

La *entactina/nidógeno* es una glucoproteína presente en menores cantidades en las láminas basales. Generalmente se la encuentra en estrecha asociación con la laminina y se cree que media la unión entre esta molécula y el colágeno IV.

Los *proteoglucanos* son componentes abundantes de las láminas basales. Su contenido en GAGs del tipo del heparán sulfato confiere a las láminas las propiedades de filtración selectiva, que depende de la naturaleza polianiónica de estas moléculas.

El *colágeno VII* forma pequeñas fibrillas en las láminas basales epiteliales (*fibrillas ancladoras*), cuyos extremos poseen una alta afinidad de unión con el colágeno IV de la lámina densa y de las *placas de anclaje* similares de la estroma conectiva. Estas fibrillas de colágeno VII forman bucles que enlazan a las fibrillas de colágeno III, de modo que fijan las láminas basales al conectivo subyacente. En ciertos epitelios sujetos a traumatismo esto es muy importante; los defectos génicos del colágeno VII son la causa de una enfermedad ampollar de la piel, de curso mortal o mutilante, denominada epidermolísis ampollar distrófica.

6-12. Los hemidesmosomas son estructuras de adhesión celular a las láminas basales

Los hemidesmosomas derivan su nombre del hecho de que su ultraestructura es similar a la de los desmosomas puntiformes, pero sólo corresponden a la mitad de estos últimos, ya que su mitad externa está representada por la lámina basal epitelial.

La placa densa citoplasmática del hemidesmosoma, donde se insertan los filamentos de citoqueratina, posee una o varias proteínas semejantes pero no idénticas a las desmoplaquinas de los desmosomas puntiformes. Las glucoproteínas transmembranas de adhesión de los hemidesmosomas no están caracterizadas en su totalidad, pero no parecen pertenecer al grupo de las desmogleínas y desmocollinas. Entre ellas se encuentran varios tipos de integrinas.

En la lámina lúcida de las láminas basales, a nivel de los hemidesmosomas se hallan unas estructuras lineales denominadas *filamentos ancladores*, en las cuales se puede demostrar con métodos inmunohistoquímicos la presencia de calinina/niceína y epiligrina, aunque existen pruebas de que estos tres nombres designan al mismo tipo de proteína. Ciertas enfermedades ampollares de la piel son causadas por defectos congénitos de estos filamentos ancladores.

6-13. Los contactos focales adhieren la matriz a células cultivadas

Dijimos que cuando se hacen crecer células en cultivo sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio o plástico) tienden a adherirse y a extenderse, y que se establecen contactos entre la superficie basal de las células y el soporte en el que se las cultiva, denominados *placas de adhesión* o *contactos focales*. En estos puntos se producen cambios llamativos tanto en el interior de la célula, a nivel del citoesqueleto, como en el exterior de la membrana plasmática, en la cubierta celular.

Los contactos focales no solo intervienen en la adherencia sino también en el movimiento de las células, y se debilitan y reducen cuando éstas experimentan transformación cancerosa. Podemos considerar también a los contactos focales como sitios que median las señales entre el citoplasma y el medio ambiente y viceversa, por medio de una interacción a través de la membrana.

Como se ilustra en la figura 5-30, A, pueden observarse contactos focales en la célula viva mediante el microscopio de interferencia; dichos contactos aparecen como zonas más oscuras de la membrana celular. En una célula recién cultivada estas áreas están dispuestas en forma radial mientras que, como se muestra en la figura, en un fibroblasto extendido están alineadas en paralelo con respecto a la dirección del movimiento. Mediante el microscopio óptico y el electrónico es posible observar que los contactos focales son los sitios de implantación de la actina contenida en los haces de microfilamentos denominados *fibras de tensión*. Las fibras de tensión parecen ser contráctiles y por eso pueden tener importancia en la generación de fuerzas tensiles entre la célula y el sustrato.

6-14. El reconocimiento y la adhesión celulares dependen de los oligosacáridos

En el capítulo 4 dijimos que la membrana plasmática está rodeada por una cubierta celular, denominada a veces glucocáliz porque contiene unidades de glúcidos incluidos en glucoproteínas, glucolípidos y proteoglucanos. Suele considerarse a la cubierta celular como equivalente a las cadenas laterales de oligosacáridos de los glucolípidos y glucoproteínas que están expuestos en la superficie de la célula (fig. 4-6) y unidos en forma covalente con los polipéptidos. No obstante esto, en muchas células existe una capa menos compacta, por fuera de la cubierta celular, compuesta principalmente por hidratos de carbono secretados por la célula. La separación entre la cubierta celular propiamente dicha y la capa externa generalmente es imposible de determinar porque se hallan en continuidad una

con la otra y tienen las mismas propiedades de coloración. Se puede colorear la cubierta celular con PAS o azul Alcian en los preparados para el microscopio óptico, o con lantano o rojo de rutenio para el microscopio electrónico (fig. 4-7).

Los hidratos de carbono pueden demostrarse más específicamente con el uso de lectinas. Estas suelen ser proteínas vegetales que se unen a la superficie celular pues interactúan específicamente con hidratos de carbono bivalentes o polivalentes; en este sentido, se las puede considerar como moléculas de reconocimiento para los oligosacáridos.

Entre las lectinas, la concanavalina A, aislada de la semilla de una leguminosa, es específica para la glucosa y la manosa, y la aglutinina de germen lo es para la N-acetilglucosamina. Las lectinas pueden marcarse con colorantes fluorescentes o con materiales opacos para su observación con el microscopio óptico y electrónico. Las lectinas se encuentran también en los tejidos animales.

La cubierta celular tiene en general un espesor de 10 a 20 nm y está en contacto directo con la hoja externa de la membrana plasmática. En las amebas se halla formada por filamentos de 5 a 8 nm de diámetro y 100 a 200 nm de longitud.

La cubierta celular posee residuos de ácido siálico cargados negativamente, tanto en las glucoproteínas como en los gangliósidos, que pueden ligar iones Ca^{2+} y Na^{+} . Si las membranas son tratadas con neuraminidasa, enzima que libera ácido siálico, se produce una reducción de la carga negativa de la membrana.

La resistencia mecánica de la cubierta varía en distintas células. Por ejemplo, la del intestino resiste mucho, mientras que la de otras células es lábil y se separa fácilmente con lavados o por acción de enzimas.

En el capítulo 8 se menciona que la biosíntesis de las glucoproteínas tiene lugar en los ribosomas del retículo endoplasmático, y que el montaje final de los oligosacáridos se realiza en el complejo de Golgi. La cubierta celular puede considerarse como un producto de secreción de la célula que es incorporado a la superficie celular y sufre una renovación constante.

Factores que median el reconocimiento celular. El factor de agregación de las esponjas

Otras propiedades de la cubierta celular están relacionadas con la capacidad de las células de "reconocer" otras similares en un tejido, de adherirse entre sí, de disociarse y reasociarse y de producir inhibición en las células vecinas. Esta última propiedad se denomina inhibición por contacto.

Para el reconocimiento molecular los oligosacáridos presentes en la cubierta celular constituyen

una especie de código molecular para la superficie de la célula. Las posibles secuencias de sus monómeros (galactosa, hexosamina, manosa, fucosa, ácido siálico, etc.) permiten un número enorme de combinaciones, de manera que cada célula puede tener una especie de marca "dactiloscópica" que permita el reconocimiento.

La historia del reconocimiento celular se remonta a los experimentos realizados en 1907 por H. V. Wilson con esponjas. Al hacer pasar forzosamente esponjas vivas a través de una fina malla de seda, las células se disgregaban; si se dejaba reposar un tiempo las células aisladas, se agregaban en racimos y, esencialmente, se volvían a formar nuevas esponjas. Este fenómeno depende de la motilidad de la célula y de cierto tipo de reconocimiento celular que permite la autoagregación celular. En efecto, si se disocian esponjas de dos especies de diferente color —por ejemplo, una roja, la otra amarilla—, hay un proceso de selección por el cual únicamente las células de la misma especie se agregan entre sí.

En manos de los Humprey y de Burger el estudio de las esponjas condujo luego a otros importantes hallazgos. Si se efectúan los experimentos antes mencionados en agua de mar artificial, en la que faltan Ca^{2+} y Mg^{2+} , las células ya no vuelven a agregarse. En este caso las células de la esponja han perdido un proteoglucano muy grande (de casi 20.000 kDa), que contiene el 50% del hidrato de carbono y que puede ser recuperado en el líquido. Este proteoglucano, denominado *factor de agregación*, cuando es añadido de nuevo al sistema puede restablecer la propiedad de autorreconocimiento y producir la agregación.

Experimentos similares fueron realizados en tejidos de embrión de pollo disociados con tripsina. Si se deja descansar la suspensión de células y se la hace rotar suavemente, se produce la reagregación. Las células similares —por ejemplo, de la retina, riñón, hueso— se adhieren entre sí formando agregados que muestran las características del tejido original. A la inversa de lo observado con las esponjas, aquí la reagregación no es específica para la especie sino para el órgano, dado que si se mezclan células de embrión de pollo y de ratón, éstas se reagregan de acuerdo con el tejido y no con la especie.

Un fenómeno interesante relacionado con el reconocimiento de una célula con otra es el de la migración de los linfocitos, en la cual éstos dejan la corriente sanguínea y entran en los tejidos linfáticos para dirigirse hacia sitios específicos de los cuales provenían. En condiciones experimentales se ha podido seguir la trayectoria de estas células marcando linfocitos con fósforo radiactivo. Los linfocitos tomados del conducto torácico de ratas e inyectados a otras ratas, se dirigieron normalmente

al bazo y a los ganglios linfáticos. Sin embargo, el tratamiento de los linfocitos con neuraminidasa o con tripsina, que altera la cubierta celular, modifica el fenómeno de migración normal y las células se acumulan en el hígado.

En todos estos fenómenos de reconocimiento celular parece esencial la presencia de glucoproteínas específicas. Ellas forman parte de la cubierta celular y pertenecen a un grupo especial de proteínas transmembranosas, algunas de las cuales ya nombramos, denominadas genéricamente *moléculas de adhesión celular*.

Moléculas de reconocimiento en células animales (moléculas de adhesión celular o CAMs)

Cadherinas. Son moléculas de adhesión homófilas, dependientes del calcio, que analizamos a propósito de las uniones intercelulares estructuradas.

Integrinas. Son una familia de receptores glucoproteicos transmembranosos que las células utilizan para unir físicamente —y para “integrar” funcionalmente, de allí su nombre— a los componentes del citoesqueleto con las moléculas de las matrices extracelulares. Alternativamente conectan a los citoesqueletos de células adyacentes. Son heterófilas, vale decir que no se unen a moléculas semejantes sino a ligandos diferentes. Estos ligandos, según cuál sea la integrina expresada por la célula —existen por lo menos 16 variantes principales de integrinas—, pueden ser el colágeno o la laminina de las láminas basales. También se pueden unir a otros múltiples ligandos, como fibrinógeno, lipoproteínas bacterianas y otros.

Su papel no se reduce al simple reconocimiento o adhesión, sino que se cree que actuarían también como transductores de señales extracelulares. Intervienen en muchos procesos biológicos importantes, como la embriogénesis, la cicatrización de heridas, la hemostasia, la trombosis, la diferenciación y renovación celulares, y en mecanismos de defensa inmunitarios.

Patológicamente poseen un papel relevante en los procesos de invasión y metástasis del cáncer y en la trombosis vascular.

Selectinas. Son miembros de una familia de proteínas transmembranosas caracterizadas por poseer dominios extracelulares de tipo lectina, vale decir, capaces de reconocer secuencias específicas de oligosacáridos. Se reconocen tres tipos principales de selectinas: E, L y P. La *selectina E* es expresada por los endotelios de las vénulas; la *selectina L* por los leucocitos, y la *selectina P* por las plaquetas y los endotelios venulares.

Son heterófilas, de modo que una selectina leucocitaria es capaz de unirse a otra endotelial. Se

comprende la importancia de esto en los procesos de adherencia y migración vascular de los leucocitos en los fenómenos inflamatorios.

Superfamilia de las inmunoglobulinas. Comprende varios miembros de moléculas de adhesión, relacionadas evolutivamente con los anticuerpos pero con funciones completamente diferentes. Son las principales moléculas de adhesión que unen a las células de manera independiente del calcio. En general la unión es homófila, pero en el caso de las ICAMs endoteliales éstas se unen a otro tipo de moléculas (integrinas) de los leucocitos. La más conocida es la N-CAM, denominada así porque inicialmente se la identificó en células nerviosas, pero su distribución abarca múltiples tipos celulares.

La adhesión intercelular mediada por las cadherinas es mucho más fuerte que la de las N-CAMs. Sin embargo, éstas parecen tener un papel importante en la regulación de las propiedades adhesivas en el curso de la embriogénesis.

6-15. La superficie celular de las células cancerosas está muy transformada

En vista de sus muchas implicancias biomédicas, el estudio de la célula cancerosa es de máxima importancia en biología celular y molecular. Este tema pudo haber sido tratado de manera global en un capítulo especial; no obstante, preferimos analizar por separado las características especiales de la célula cancerosa que la diferencian de la célula normal al considerar los diversos componentes celulares. Por tal motivo se encontrarán referencias acerca de la célula cancerosa en los capítulos relacionados con la superficie celular, el citoesqueleto, el núcleo y los cromosomas. La biología molecular de la transformación celular —es decir, el cambio de célula normal a cancerosa— se considera principalmente en el capítulo 15.

Las células cancerosas se distinguen por un crecimiento incontrolado, con invasión de otros tejidos y diseminación a otros sitios del organismo para producir tumores secundarios. Todas estas características sugieren que las células cancerosas han escapado a los controles que regulan el crecimiento normal. Los tumores cancerosos son monoclonales, es decir, derivan de la división de una célula única que se ha transformado en célula cancerosa.

Las células cancerosas tienen muchas diferencias estructurales y bioquímicas con respecto a las células normales. Por ejemplo, a menudo el cariotipo es anormal, con cambios del número de cromosomas o alteraciones cromosómicas. Las células malignas generalmente tienen una mayor actividad glucolítica. El citoesqueleto, formado por una red de microtúbulos, microfilamentos de actina y filamentos intermedios, está reducido o desorganiza-

Células cancerosas y transporte de hierro

Una diferencia importante entre las células normales y las cancerosas atañe al metabolismo del hierro e iones de metales esenciales. El transporte y la entrega de hierro a las células se efectúan principalmente por medio de la transferrina, una glucoproteína que se encuentra en el plasma sanguíneo que fija el metal y lo asocia con receptores de transferrina específicos en la membrana celular. Estos receptores son glucoproteínas formadas por dos subunidades de 95 kDa unidas por uniones disulfuro. Luego de su penetración en la célula, el hierro se fija a otras proteínas, como la ferritina, y es depositado para ser usado por muchos sistemas enzimáticos —por ejemplo, los citocromos—. La transferrina es esencial para el crecimiento de células normales en cultivos y debe estar presente en el medio para mantener el ciclo vital. Las células normales probablemente se adapten a la privación de hierro modificando la capacidad de fijación de la transferrina. No obstante esto, algunas células cancerosas pueden adaptarse por otro mecanismo.

Se observó que las células transformadas por virus oncogénicos secretan un agente de bajo peso molecular —llamado factor de crecimiento siderofílico— que tiene una gran capacidad de fijación del hierro —al actuar como agente quelante— y de transporte del metal en el interior de la célula —al actuar como un ionóforo o canal—.

En la figura 6-17 está representada esquemáticamente la diferencia en el transporte de iones metálicos entre la célula normal y la transformada. Los iones metálicos, como el hierro y el galio, desempeñan un papel en los mecanismos reguladores del crecimiento que activan el programa de división celular (cap. 15). En una célula normal, los receptores del complejo transferrina-metal son sintetizados e integrados en la membrana. En una célula transformada, los factores de crecimiento sideróforos son liberados al medio, donde se unen al metal compitiendo con la transferrina. El complejo sideróforo-metal es transportado entonces hacia el interior de la célula. Mediante este mecanismo alternativo, las células cancerosas pueden disminuir su dependencia de la transferrina y son capaces de competir con las células normales por los iones metálicos esenciales.

Fibronectina y células cancerosas

Uno de los principales componentes químicos de la cubierta celular es la fibronectina, una glucoproteína de alto peso molecular que puede ser aislada de fibroblastos normales cultivados por procedimientos suaves, como el lavado con una solución de urea. Junto con otras glucoproteínas, la

fibronectina se encuentra en las “huellas” que deja una célula cultivada en movimiento sobre el sustrato con el cual se pone en contacto (por ejemplo, una superficie de vidrio). La fibronectina se halla en abundancia en el tejido conectivo, entre otros, y se cree que desempeña algún papel en la distribución de las células en los tejidos embrionarios y adultos. La presencia de fibronectina aumenta la adherencia celular al sustrato y a otras células e influye en la morfología de la célula, lo mismo que en la inducción de su locomoción y migración.

La fibronectina falta o está sensiblemente reducida en células cultivadas en proceso de transformación cancerosa. Puede concebirse que la reducción de la fibronectina, junto con el desacoplamiento antes mencionado, tenga efectos desfavorables sobre el comportamiento “social” de las células transformadas.

Este cambio podría explicar la tendencia de las células cancerosas a romper las conexiones con otras células, a invadir localmente los tejidos y a hacer metástasis —es decir, invadir tejidos distantes por vía de los vasos linfáticos y sanguíneos—.

Se ha observado que el agregado de fibronectina a células cultivadas transformadas produce cambios en su comportamiento que les otorgan un aspecto más normal. Por ejemplo, se unen con mayor facilidad al sustrato, adoptan una morfología más aplanada y tienden a alinearse entre sí formando una monocapa. También por influencia de la fibronectina el citoesqueleto de una célula transformada se vuelve más organizado.

Las integrinas están involucradas asimismo en los procesos de invasión y metástasis de las células tumorales.

Pérdida del control de crecimiento en las células cancerosas

Los cambios antes mencionados en la superficie celular de las células cancerosas se reflejan en su comportamiento en los cultivos.

Las células normales que crecen en un cultivo de tejido tienden a establecer contactos celulares con las células vecinas. En los puntos de adherencia aparece una especie de “placa” densa; al mismo tiempo, el movimiento de las prolongaciones celulares se hace más lento y se produce su inhibición.

Por el contrario, las células cancerosas no se adhieren y no muestran este tipo de inhibición por contacto. En estas células hay mayor número de prolongaciones en la superficie celular. Esta diferencia se advierte con claridad en micrografías electrónicas de barrido de células cancerosas (fig. 6-18).

En condiciones experimentales, cuando las células normales han sido rodeadas completamente por otras células, se detiene su movilidad y tienden a

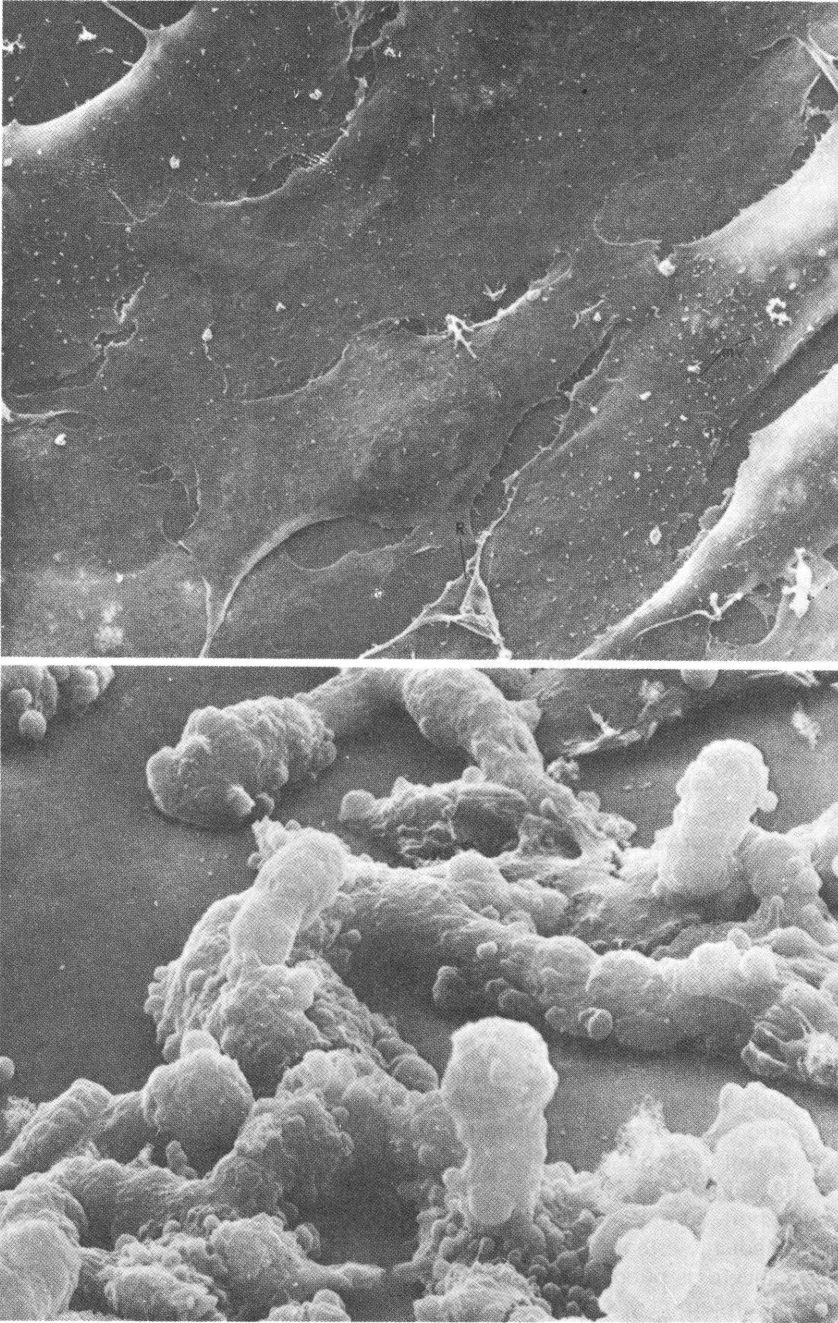


FIG. 6-18. Micrografía electrónica de barrido de células cultivadas. **Arriba.** Células de embrión de hámster bien extendidas. Se observan pocas vellosidades y pliegues. 1.620 $\times$. **Abajo.** Células semejantes, pero después de la transformación cancerosa por adenovirus humano. Adviértase que las células presentan protuberancias en la superficie y tienden a formar varias capas. 3.145 $\times$. (Cortesía de R. D. Goldman.)

formar una monocapa (fig. 6-19, A). Al mismo tiempo, hay inhibición del crecimiento y el número de células en la cápsula de Petri se mantiene casi constante. Por otro lado, las células cancerosas continúan multiplicándose y tienden a apilarse forman-

do masas irregulares de varias capas de profundidad (fig. 6-19, B). La pérdida de la inhibición por contacto se observa fácilmente en células normales cultivadas que han sido "transformadas" por virus oncogénicos (que producen cáncer en animales).

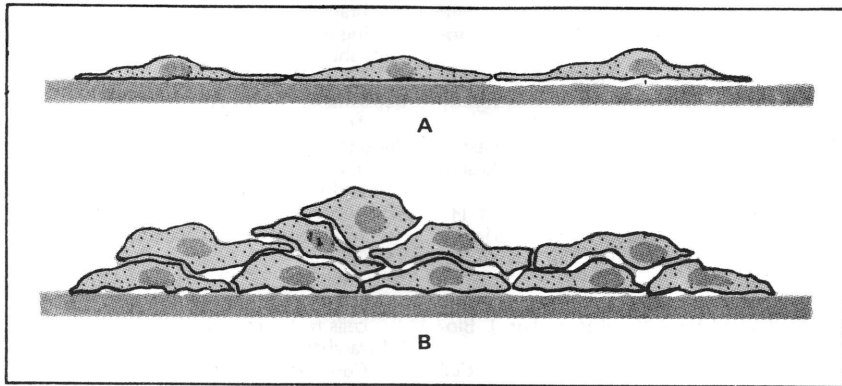


FIG. 6-19. **A.** Crecimiento normal de células en cultivo sobre un sustrato sólido. Obsérvese que las células se inhiben por el contacto y dejan de multiplicarse, y forman una monocapa. **B.** Las células transformadas siguen multiplicándose y forman multicapas. (De N. R. Ringertz y R. E. Savage [1976] In: *Cell Hibrids*. Academic Press, New York.)

BIBLIOGRAFIA

- Amagai M., Klaus-Kovtun V. and Stanley J. R. (1991) Auto-antibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67:869.
- Albelda S. M. and Buck C. A. (1990) Integrins and another cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4:2868.
- Anderson J. M., Stevenson B. R., Jesaitis L. A., Goodenough D. A. and Mooseker M. S. (1988) Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 106:1141.
- Anderson J. M., Fanning A. S., Lapierre L. and Vanitalle C. M. (1995) Zonula occludens ZO-1 and ZO-2: Membrane associated guanylate cyclase homologues. *Biochem. Soc. Trans.* 23:470.
- Ballard S. T., Hunter J. H. and Taylor A. E. (1995) Regulation of tight-junction permeability during nutrient absorption across the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Nutr.* 15:35.
- Behrens J., Frixen U., Schipper J., Weidner M. and Birchmeier W. (1992) Cell adhesion in invasion and metastasis. *Semin. Cell Biol.* 3:169.
- Bennett M. V. L. et al. (1991) Gap junctions: New tools, new answers, new questions. *Neuron* 6:305.
- Bevilacqua M. P. and Nelson R. M. (1993) Selectins. *J. Clin. Invest.* 91:379.
- Boller K., Vestweber D. and Kemler R. (1985) Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 100:327.
- Brichmeier W. (1993) Molecular aspects of epithelial-mesenchymal interactions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:9.
- Brown J. C. and Timpl R. (1995) The collagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107:484.
- Burgeson R. E. (1988) New collagens, new concepts. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:551.
- Burridge K. et al. (1988) Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:487.
- Buxton R. S. and Magee A. I. (1992) Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. *Semin. Cell Biol.* 2:157.
- Buxton R. S. et al. (1993) Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J. Cell Biol.* 121:481.
- Cascio M., Kumar N. M., Safarik R. and Gilula N. B. (1995) Physical characterization of gap junction connexons (hemi-channels) isolated from rat liver. *J. Biol. Chem.* 270:18643.
- Clark E. and Brugge J. S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268:233.
- Domloge-Hultsch N. et al. (1992) Epiligrin, the major keratinocyte integrin ligand, is a target in both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering skin disease. *J. Clin. Invest.* 90:1628.
- Eaton S. and Simons K. (1995) Apical, basal and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* 82: 5.
- Farquhar M. G. and Palade G. E. (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 17:375.
- Fasano A. (1995) Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, in vitro. *J. Clin. Invest.* 96:710.
- Fish E. M. and Molitoris B. A. (1994) Alterations in epithelial polarity and the pathogenesis of disease states. *N. Engl. J. Med.* 330:1580.
- Fransson L. A. (1987) Structure and function of cell-associated proteoglycans. *Trends Biochem. Sci.* 12:406.
- Garrod D. R. (1993) Cell to cell and cell to matrix adhesion. *Br. Med. J.* 306:703.
- Garrod D. R. (1993) Desmosomes and hemidesmosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:30.
- Gorelik E., Duty L., Anaraki F. and Galli U. (1995) Alterations of cell surface carbohydrates and inhibition of metastatic property of murine melanomas by α 1,3 galactosyltransferase gene transfection. *Cancer Res.* 55:4168.
- Green K. J. et al. (1992) Comparative structural analysis of desmoplakin, bullous pemphigoid antigen and plectin: Members of a new gene family involved in organization of intermediate filaments. *Int. J. Biol. Macromol.* 14:153.
- Guadagno T. M., Ohtsubo M., Roberts J. M. and Assoian R. K. (1993) A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* 262:1572.
- Gumbiner B., Stevenson B. and Grimaldi A. (1988) The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J. Cell Biol.* 107:1575.
- Guthrie S. C. and Gilula N. B. (1989) Gap junctional communication and development. *TINS* 12:12.
- Hay E. D. (1991) Extracellular matrix, cell skeleton and embryonic development. *Am. J. Med. Genet.* 34:14.
- Hay E. D. (ed.) (1992) *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd Ed. Plenum Press, New York.
- Hennings L., Barry S. T. and Critchley D. R. (1995) Cell-matrix adhesion: Structure and regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 23:619.
- Kadler K. (1995) Extracellular matrix: Fibril-forming collagens. *Proteina Profiles* 2:491.

- Kato H. et al. (1995) Focal adhesion proteins associated with apical stress fibers of human fibroblasts. *Cell. Motil. Cytoskel.* 31:177.
- Kemler R. (1992) Classical cadherins. *Semin. Cell Biol.* 3:149.
- Kintner C. (1992) Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. *Cell* 69:225.
- Klymkowsky M. W. and Parr B. (1995) The body language of the cells: The intimate connection between cell adhesion and behavior. *Cell* 83:5.
- Koukoulis G. K., Virtanen I., Howeedy A. A., Warren W. H., Gould V. E. (1994) Immunolocalization of integrins in the normal and neoplastic lung epithelium. *Lab. Invest.* 70: 152.
- Kuo H. S., Keene D. R. and Glanville R. W. (1995) The macromolecular structure of type-IV collagen. *Eur. J. Biochem.* 232:364.
- Lingenmayer T. F. (1992) Collagen. In Hay, E. D. (ed.) *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd Ed., pp. 7-44. Plenum Press, New York.
- Lorant D. E. et al. (1993) Inflammatory roles of P-selectin. *J. Clin. Invest.* 92:559.
- Lucas W. J. (1995) Plasmodesmata: Intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:673.
- Mayne R. and Brewton R. G. (1993) New members of the collagen superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:883.
- McDonnald J. A. (1988) Extracellular matrix assembly. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:183.
- Miller A. (1995) Quantitative junctional permeability measurements using the confocal microscope. *Mic. Res. Tech.* 31:387.
- Mooseker M. S. (1985) Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1:209.
- Nelson W. J. and Hammerton R. W. (1989) A membrane-cytoskeletal complex containing Na⁺-K⁺ ATPase, ankyrin, and fodrin in MDCK cells. Implications for the biogenesis of epithelial cell polarity. *J. Cell Biol.* 108:893.
- Noirot-Timothee C. and Noirot C. (1980) Septate and scalariform junctions in arthropods. *Int. Rev. Cytol.* 63:97.
- Parry D. A. (1988) The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. *Biophys. Chem.* 29:195.
- Parsons J. T., Schaller M. D., Hildenbrand J., Leu T. H., Richardson A. and Otey C. (1994) Focal adhesion kinase: Structure and signaling. *J. Cell. Sci. Suppl.* 18:109.
- Paul D. L. (1995) New functions for gap junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 665.
- Pellat Deceunynck C. et al. (1995) Adhesion molecules on human myeloma cells: Significant changes in expression related to malignancy, tumor spreading and immortalization. *Cancer Res.* 55:3647.
- Rosales C., O'Brien V., Kornberg L. and Juliano R. (1995) Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochem. Biophys. Acta* 1242:77.
- Rouselle P., Lunstrum G. P., Keene D. R. and Burgeson R. E. (1991) Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J. Cell Biol.* 14:567.
- Ruoslahti E. (1988) Fibronectin and its receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 57:375.
- Ruoslahti E. (1988) Structure and biology of proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:229.
- Ruoslahti E. (1992) Integrins as receptors for extracellular matrix. In Hay E. D. (ed.) *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd Ed., pp. 343-361. Plenum Press, New York.
- Schneeberger E. E. and Lynch R. D. (1992) Structure, function and regulation of cellular tight junctions. *Am. J. Physiol.* 262:647.
- Schoenenberger C. A., Zuk A., Kendall D. and Matlin K. S. (1991) Multilayering and loss of apical polarity in MDCK cells transformed with viral k-ras. *J. Cell Biol.* 112:873.
- Schwarzbauer J. E. (1992) Fibronectin: From gene to protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:780.
- Severs N. J. (1995) Microscopy of the gap junction: A historical perspective. *Mic. Res. Tech.* 31:338.
- Sgaz J. C., Berthoud V. M., Moreno A. P. and Spray D. C. (1993) Gap junctions: Multiplicity of controls in differentiated and undifferentiated cells, and possible functional implications. *Adv. Sec. Mess. Phos. Res.* 27:163.
- Sillett S., Yao J. P., Pienta K. J. and Ras A. (1995) Loss of cell-contact regulation and altered responses to autocrine motility factor correlate with increased malignancy in prostate cancer cell. *Cancer* 63:100.
- Sonnenberg A. et al. (1991) Integrin $\alpha_6\beta_4$ complex is located at hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J. Cell Biol.* 113: 907.
- Stanley J. R. (1993) Cell adhesion molecules as targets of autoantibodies in pemphigus and pemphigoid bullous diseases due to defective epidermal cell adhesion. *Adv. Immunol.* 53:291.
- Stetler-Stevenson W. G., Aznavoorian S. and Liotta L. A. (1993) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:541.
- Takeichi M. (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:619.
- Tsukita S., Nagatuchi A. and Yonemura S. (1992) Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:834.
- van Meer G. and Simons K. (1986) The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell-surface domains of MDCK cells. *EMBO J.* 5:1455.
- Yamada K. M. and Miyamoto S. (1995) Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:681.
- Young J., Cohn D. A. and Gilula N. B. (1987) Functional assembly of gap junction conductance in lipid bilayers: Demonstration that the major 27 kd protein forms the junctional channel. *Cell* 48:733.
- Yurchenco P. D. and Schittny J. C. (1990) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4:1577.

7/ Señalización intercelular

Roberto Ponzio

RECEPCION, TRANSDUCCION Y AMPLIFICACION DE LAS SEÑALES INTERCELULARES

La existencia de organismos multicelulares, en los que cada una de las células individuales debe cumplir con sus actividades de acuerdo con los requerimientos del organismo como un todo, exige que las células posean un sistema de generación, transmisión, recepción y respuesta de una multitud de señales que las comuniquen e interrelacionen funcionalmente entre sí. Estas señales que permiten que unas células influyan en el comportamiento de otras son fundamentalmente químicas.

Dentro de territorios tisulares restringidos, las comunicaciones intercelulares pueden efectuarse mediante contactos directos célula-célula. En el capítulo anterior mencionamos que las *uniones nexo* permiten el intercambio directo de moléculas pequeñas entre células adyacentes; de la misma manera se pueden coordinar las actividades metabólicas de las células vegetales a través de los *plasmodesmos*.

De modo algo más indirecto, las células adyacentes están relacionadas por diversos tipos de *moléculas de adhesión* (CAMs) que, como vimos en el capítulo 6-15, no solamente conectan físicamente a las células entre sí o con las matrices extracelulares que las rodean, sino que modifican su comportamiento en lo referente a la diferenciación, proliferación, migración y otros aspectos metabólicos de la actividad celular.

En la mayor parte de los casos, sin embargo, las células deben comunicarse entre sí a distancias mucho mayores de lo que les permiten sus contactos directos. En esta circunstancia la señalización se realiza por medio de moléculas sintetizadas y liberadas al exterior celular, que llegan por diversas vías a las *células blanco* o *diana* a las que van dirigidas (fig. 7-1):

a) En la *señalización paracrina*, de corto alcance, la célula reguladora elabora y secreta las señales moleculares hacia el medio extracelular, donde difunden y llegan a las diversas células sobre las que ejercen su acción.

En algunas ocasiones, el mediador químico afecta no sólo a las células vecinas sino a la propia célula productora de la señal; se habla entonces de *señalización autocrina*.

b) En la *señalización endocrina*, las señales moleculares (*hormonas*) son secretadas y distribuidas por el torrente circulatorio hacia la totalidad del organismo, para ejercer su acción reguladora sobre las células blanco localizadas habitualmente a distancias considerables.

c) La *señalización sináptica* es un caso especial de comunicación intercelular rápida que depende de la secreción de señales muy específicas (*neurotransmisores* o *mediadores sinápticos*), dirigidas puntualmente a pequeñas áreas de la membrana de una o más células blanco. A pesar de que la secreción sináptica se efectúa hacia un espacio intercelular estrecho (hendidura sináptica), los cuerpos celulares de las células intervinientes se pueden encontrar muy alejados. Las características de la señalización sináptica, así como otras particularidades de las células nerviosas, serán analizadas hacia el final de este capítulo.

7-1. Las señales externas deben acceder al interior celular por uno de dos mecanismos posibles

Para modificar el comportamiento biológico de las células a las que llegan, las moléculas señalizadas deben influir de algún modo sobre elementos citoplasmáticos o nucleares de las células blanco, activando o inactivando sistemas enzimáticos o modificando su actividad génica. Este proceso, por el cual un estímulo extracelular induce una res-

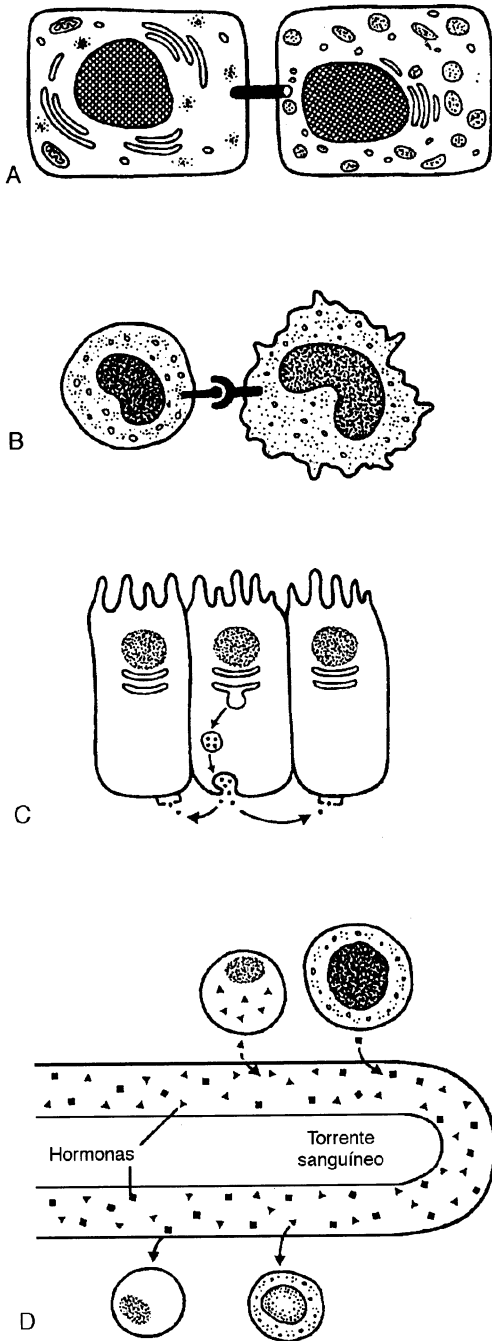


FIG. 7-1. Formas de comunicación intercelular de acuerdo con el tipo de contactos celulares establecidos y con la manera como las señales moleculares son llevadas hasta sus células blanco. A y B. Comunicación intercelular directa mediada por uniones comunicantes (nexos) y por proteínas transmembranosas con afinidad de receptor-ligando, respectivamente. C. Secreción paracrina. D. Secreción endocrina.

puesta de la célula blanco, se denomina *transducción de la señal*.

La capacidad de las células blanco para responder a los estímulos moleculares depende de manera absoluta de la existencia en ellas de *receptores específicos* para dichas moléculas.

Pese a que algunas señales moleculares —como las hormonas esteroideas, por ejemplo— pueden penetrar directamente en el interior celular, donde se encuentran sus *receptores citosólicos*, en la mayor parte de los casos las señales son moléculas hidrofílicas, a veces de considerable tamaño, que no pueden atravesar la membrana plasmática. En estos casos las células blanco disponen de *receptores externos*, representados por glucoproteínas transmembranosas distribuidas en la superficie celular, que detectan la llegada de su *ligando* (la molécula señal) y activan una ruta de transmisión, amplificación y transducción de la señal (fig. 7-2) que se propaga hacia el citoplasma y el núcleo de las células.

7-2. Las señales moleculares hidrofóbicas difunden a través de las membranas

El óxido nítrico activa directamente a la guanilato ciclasa citosólica

El *óxido nítrico* (NO) es un gas en condiciones normales de presión y temperatura. Se trata de una molécula de comunicación a corta distancia (paracrina) altamente reactiva, potencialmente tóxica, generada principalmente por células endoteliales, macrófagos y neuronas por medio de la enzima *óxido nítrico sintasa* (NOS) a partir del aminoácido L-arginina, oxígeno y NADPH.

Existen dos tipos principales de NOS: la *NOS constitutiva* (presente en neuronas, endotelios, plaquetas, médula suprarrenal y mácula densa), que se almacena en el citoplasma y es activada por el sistema calmodulina-calcio, y la *NOS inducible* (presente en macrófagos, células mesangiales y otras), independiente del calcio.

Dadas sus propiedades físicas, el óxido nítrico difunde libremente desde el citoplasma de las células productoras hacia las vecinas, en las que penetra por difusión simple y actúa sobre la enzima *guanilato ciclasa soluble*, responsable de la síntesis de *guanosina monofosfato cíclico* (GMPc), similar al más conocido *AMPc* que actúa como segundo mensajero (véase más adelante).

La acción del óxido nítrico es fugaz, ya que subsiste sólo cinco a diez segundos antes de ser oxidado en nitratos y nitritos. En ese breve lapso activa directamente a la guanilato ciclasa, y en ese sentido es diferente de las otras moléculas señalizadas que analizaremos más adelante, que en todos los casos

deben unirse específicamente a un receptor proteico membranoso o intercelular como paso previo a la transducción de la señal.

Las primeras evidencias de la producción celular de óxido nítrico se remontan a comienzos de la década de 1980. Se demostró que cuando los macrófagos son estimulados por toxinas bacterianas o por citoquinas de linfocitos T, pueden reaccionar generando NO, que al difundir al exterior interfiere en el metabolismo de las células tumorales y de los microorganismos y posibilita su destrucción. Más tarde se pudo apreciar el efecto del NO de los macrófagos activados sobre los vasos sanguíneos en los fenómenos inflamatorios locales, lo mismo que el de su producción incontrolada por los numerosos macrófagos que reaccionan en las infecciones bacterianas severas, que puede provocar vasodilatación periférica masiva con colapso circulatorio.

Este caso particular no es el de una verdadera señalización intercelular sino un efecto citotóxico mediado por el NO como radical libre, pero permitió estudiar en detalle el sistema de síntesis celular de esta sustancia, así como su mecanismo de acción.

Para la misma época se describió el llamado *factor de relajación derivado del endotelio* (EDRF), un potente vasodilatador que es generado por las células endoteliales en respuesta a la acetilcolina liberada por la inervación vasomotora relajante. No fue hasta 1987 que Moncada demostró que el EDRF era en realidad óxido nítrico —y su metabolito estrechamente relacionado, un nitrosotiol—, que al ser producido por el endotelio difundía y relajaba el músculo liso arteriolar al aumentar su producción de GMPc (fig. 7-3). Esta es la base terapéutica del tratamiento de la angina de pecho —producida por la constricción de las arterias coronarias— con nitratos orgánicos del tipo de la nitroglicerina. Esta

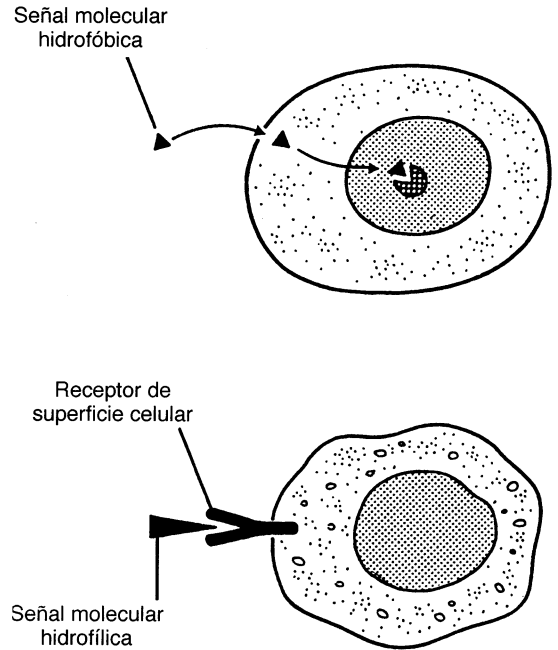


FIG. 7-2. Formas de ingreso a la célula de las señales moleculares. A. La señal molecular hidrofóbica penetra en todas las células por difusión simple a través de la membrana y ejerce su acción en aquellas que poseen receptores específicos en sus citoplasmas. B. La señal molecular hidrofílica no puede penetrar en la célula, por lo que se une a un receptor transmembranoso.

sustancia, utilizada por Alfred Nobel —que posteriormente instituyera el premio que lleva su nombre— como componente explosivo de la dinamita, es también un potente relajante arteriolar cuando se la administra al organismo, ya que es captada por las células musculares lisas y convertida en nitrosotioles.

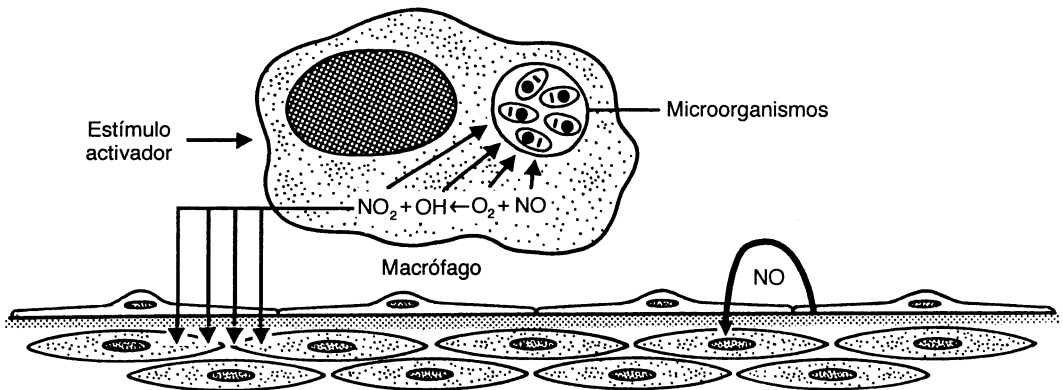


FIG. 7-3. Esquema del mecanismo de generación y difusión del óxido nítrico en una arteriola. En este caso el estímulo nervioso vasodilatador generado por la acetilcolina induce la producción de NO endotelial, que difunde al músculo liso arteriolar y lo relaja. Los macrófagos activados también producen NO. (Véase la explicación en el texto.)

Un hallazgo relativamente reciente fue que el óxido nítrico puede actuar en la transmisión sináptica. Como se sabe, la mayor parte de las neuronas cerebrales utilizan glutamato como neurotransmisor. En algunas de estas sinapsis, el glutamato liberado por las vesículas sinápticas actúa sobre un subtipo especial de receptores postsinápticos (denominados NMDA) que promueven la apertura de canales de calcio con la consecuente entrada de éste a la neurona. El calcio, a su vez, se une a la calmodulina, que cambia de conformación y es capaz de activar a la NO sintasa constitutiva, lo cual incrementa los niveles del segundo mensajero GMPC.

El papel preciso del óxido nítrico en las neuronas aún no se conoce. Existen evidencias indirectas de que la acción relajante muscular de las neuronas del plexo mientérico de Auerbach podría deberse a esta sustancia. También es liberado por las neuronas ganglionares que innervan a las células cromafines de la médula suprarrenal.

En el cerebro sólo un 2% de las neuronas de la corteza parece poder generar NO, mientras que la mayor parte de las neuronas de ciertos núcleos hipotalámicos —como el paraventricular y el supraóptico— poseen NO sintasa. En cierto modo el NO puede actuar como un neurotransmisor, pero de una clase completamente nueva y diferente de todos los demás ya que se sintetiza localmente en cuestión de milisegundos, sólo en función de la demanda inmediata, no se almacena en vesículas sinápticas sino que difunde a las neuronas vecinas, y activa en forma directa a una enzima de dichas neuronas sin unirse previamente a receptores específicos.

Las hormonas esteroideas y las tiroideas foliculares (T_3 y T_4) se unen a receptores intracelulares

En el organismo existen señales moleculares que son capaces de penetrar en las células y de modificar el comportamiento de éstas mediante el control de la actividad de algunos de sus genes. Entre sus principales exponentes se encuentran las hormonas esteroideas —estrógenos, andrógenos, progesterona y corticoides de los vertebrados; ecdisona en los insectos—, la tiroxina, el ácido retinoico y otras.

Como en el caso del óxido nítrico, estas pequeñas moléculas hidrofóbicas son capaces de penetrar por difusión simple a través de las membranas plasmáticas de todas las células. En algunas de éstas —las *células blanco* de la hormona— existen proteínas citosólicas o nucleares capaces de unirse específicamente a las hormonas: son sus *receptores intracelulares*, sin los cuales las señales no son ca-

paces de ejercer ningún efecto. Todos estos receptores hormonales pertenecen a una *superfamilia* de proteínas relacionadas entre sí, que son *factores de transcripción* específicos inactivos (cap. 12). Mientras no están unidos a su ligando permanecen libres en el citosol o en el núcleo; más raramente se unen a regiones reguladoras de los genes, pero en conformación inactiva.

Cuando las señales moleculares penetran en la célula se unen específicamente a sus receptores, que sufren un cambio de conformación y pueden así actuar, unidos en forma dimérica a segmentos reguladores específicos de determinados genes, como activadores o (más raramente) como inactivadores génicos. En estos casos, si el producto de los genes activados es un sistema enzimático, por ejemplo, se obtiene una respuesta celular a los pocos minutos de la llegada de la hormona.

Más comúnmente, los genes activados inicialmente se expresan en proteínas que actúan como factores de transcripción para un segundo grupo de genes más específicos. Se habla entonces de *genes de respuesta temprana*, en el primer caso, y *genes de respuesta tardía*, en el segundo. Como veremos más adelante, en la activación génica que resulta de la unión de señales moleculares con receptores de membrana se mantiene el mismo esquema.

7-3. Las señales hidrofílicas deben unirse al dominio extracelular de receptores transmembranosos

Dijimos al principio de este capítulo que una característica general del sistema de comunicación celular es que la señal externa de alguna manera debe atravesar la membrana. En la sección 7-1 mencionamos que las pequeñas moléculas liposolubles penetraban ellas mismas para ejercer su acción en el interior celular.

Ahora veremos que en la mayor parte de la señalización molecular *sólo la información* es transmitida al citoplasma y al núcleo por diversos mecanismos, mientras que las moléculas hidrofílicas utilizadas para generar la señal quedan retenidas en los receptores de la superficie celular y nunca atraviesan la bicapa lipídica. Estas moléculas son péptidos relativamente grandes, como las hormonas adenohipofisarias, la insulina, los factores de crecimiento, las moléculas de las matrices extracelulares o de la cubierta de otras células. También pueden ser moléculas pequeñas cargadas, como la adrenalina o la histamina.

Existen tres clases principales de receptores de membrana (fig. 7-4): los receptores canales regulados por neurotransmisores, los receptores enzimas o relacionados con enzimas y los receptores relacionados con proteínas G.

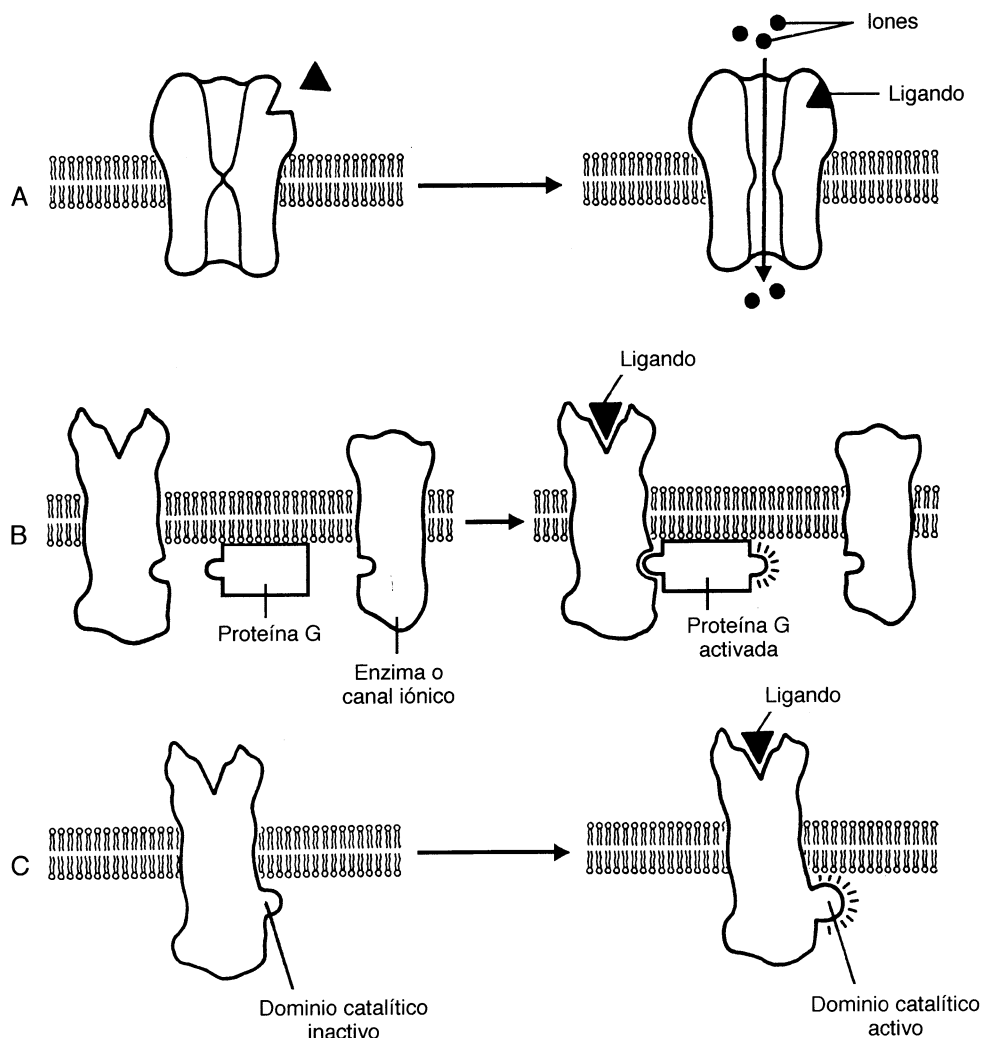


FIG. 7-4. Tipos de receptores transmembranosos (véase la descripción en el texto). A. Receptor canal regulado. B. Receptor relacionado con proteína G. C. Receptores con actividad enzimática.

1. **Receptores canales regulados por neurotransmisores.** Actúan simultáneamente como receptores y como canales iónicos que convierten a las señales químicas en señales eléctricas a nivel de las sinapsis. Se analizarán más adelante, cuando tratemos el caso de la comunicación interneuronal.

2. **Receptores enzimas o relacionados con enzimas.** Son proteínas transmembranosas inactivas que, al unirse a sus ligandos específicos por medio de sus dominios extracelulares, experimentan un cambio conformacional que posibilita la actividad enzimática, que habitualmente reside en el dominio citosólico de ellas mismas o en proteínas estrechamente relacionadas con esos dominios.

Recordemos que los cambios de conformación que experimentan las proteínas al relacionarse físicamente con otras moléculas o al ser modificadas

químicamente consisten en variaciones tanto de forma como de función. En el caso de las proteínas que intervienen en la propagación intracelular de las señales, el cambio químico más frecuente es la fosforilación o desfosforilación a cargo de las enzimas *quinasas* y *fosfatasa*s, respectivamente.

Existen varias clases de receptores transmembranosos que son enzimas o están relacionados con ellas:

a) **Receptores asociados a quinasas de tirosina.** Estos receptores en sí mismos no poseen un dominio citosólico catalítico (no son quinasas), pero al unirse con sus ligandos activan a quinasas membranosas asociadas (principalmente de las familias *src* y *Janus*), que a su vez fosforilan a una serie de sustratos. Los ligandos de este tipo de receptores incluyen moléculas variadas e importantes, como la

mayor parte de las citoquinas y algunas hormonas proteicas como la prolactina o la STH.

La familia *Janus* de quinasas de tirosina comprende varios miembros principales (*Tyk2*, *Jak1*, *Jak2* y *Jak3*), que son componentes integrales de muchos procesos de señalización mediados por citoquinas. Las Jaks actúan activando a un grupo de proteínas citosólicas denominadas STAT (por su nombre descriptivo en inglés de *signal transducers and activators of transcription*) que entonces pueden ser translocadas al núcleo, donde se unen a regiones reguladoras del ADN y activan a una serie de genes de respuesta temprana.

Lo mismo que otras proteínas que son fosforiladas por quinasas específicas en la respuesta celular, las STAT son desfosforiladas por sus respectivas fosfatasa que las inactivan.

b) **Receptores quinasas de tirosina.** En este grupo se incluyen los receptores para un gran número de *factores de crecimiento* que, como se verá en el capítulo 15, son péptidos que regulan la multiplicación y diferenciación celular. Estos receptores inactivos en general forman agregados diméricos al unirse a sus ligandos (los factores de crecimiento) y ello permite que se fosforilen mutuamente y se activen en forma recíproca. La activación consiste en que ellos mismos desarrollan la propiedad de fosforilar al aminoácido tirosina de los péptidos específicos que constituyen su sustrato.

Entre los receptores quinasas de tirosina se encuentran los productos proteicos de los proto-oncogenes *c-erb*, que son receptores de *factores de crecimiento epidérmico* (EGF); también existen receptores quinasas para el *PDGF plaquetario*, la *insulina*, el *IGF-1* y muchos otros.

Los péptidos fosforilados y activados por estos receptores incluyen las proteínas *GAP* o la *γ-fosfolipasa C*, que intervienen en los procesos de regulación de la proliferación celular, pero en otros casos sus sustratos actúan de manera no bien comprendida.

TABLA 7-1. Algunos procesos fisiológicos mediados por proteínas G

Respuesta fisiológica	Señal molecular
Glucogenólisis	Adrenalina
Secreción de mastocitos	Antígeno-IgE
Activación leucocitaria	Péptidos f-met y otros quimiotácticos
Disminución del ritmo cardíaco	Acetilcolina
Modificación de la conducta en <i>Aplysia</i>	Serotonina

Según Stryer y Bourne (1988).

c) **Receptores quinasas de serina/treonina.** Como los del grupo anterior, son capaces de fosforilar aminoácidos (en este caso serina y treonina) de diversos péptidos citosólicos. Comprenden los receptores para las diversas isoformas de la familia de factores de crecimiento *TGF-β*, cuyos miembros poseen una amplia gama de funciones, como el estímulo para la colagenización de las matrices (fibrosis) en inflamaciones crónicas o la inhibición del crecimiento producida por el *factor antimülleriano* secretado por las células de Sertoli embrionarias.

d) **Receptores fosfatasa.** Su principal representante es el *CD45*, que interviene en la activación linfocitaria antígenoespecífica. Remueve fosfatos de la tirosina de proteínas citosólicas.

e) **Receptores guanilato ciclasas.** Son receptores transmembranosos cuya actividad enzimática productora de GMP cíclico es desencadenada por la unión del ligando específico al dominio extracelular del receptor enzima. Este mecanismo es utilizado por las hormonas diuréticas (ANP) secretadas por los cardiocitos auriculares. El GMPc generado es empleado como segundo mensajero de la misma manera que el AMPc producido por la activación de las proteínas G (véase más adelante).

3. **Receptores relacionados con proteínas G.** Comprenden una enorme superfamilia de proteínas transmembranosas. La variedad de sus ligandos es muy grande: hormonas de diversos tipos, neurotransmisores, moléculas de adhesión celular, mediadores químicos locales, etc. Algunos de los procesos fisiológicos mediados por receptores relacionados con proteínas G se mencionan en la tabla 7-1.

Estos receptores se caracterizan por ser todos ellos proteínas de siete pasos, vale decir que atraviesan siete veces la bicapa lipídica de la membrana. Aun para el mismo ligando existen múltiples formas alternativas de receptor en diferentes tipos celulares; para el caso de la adrenalina, por ejemplo, se detectaron alrededor de diez clases de receptores, y no en todos los casos se conocen sus diferencias funcionales o de regulación farmacológica.

La unión del ligando con este tipo de receptor transmembranoso origina un cambio conformacional en éste que le permite relacionarse con una proteína G.

7-4. Las proteínas G son transductores intramembranosos entre los receptores y los efectores (enzimas)

Las *proteínas G* son heterotrímeros de membrana constituidos por subunidades peptídicas α , β y γ asociadas; la subunidad α está unida a una molécula de GDP y el conjunto constituye la confor-

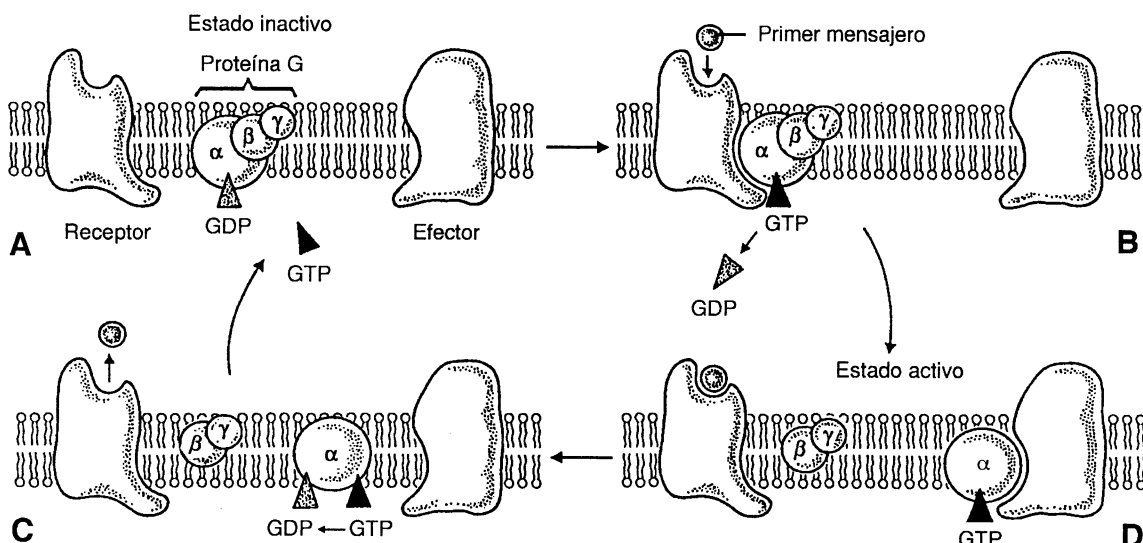


FIG. 7-5. Mecanismos de activación y de acción de las proteínas G. **A.** Estado inicial. **B.** La unión de la señal molecular (primer mensajero) con su receptor produce un cambio de configuración de éste, que se pone en contacto y activa a la proteína G, que a su vez cambia su GDP asociado por GTP. **C.** La subunidad α de la proteína G se disocia del trómero y activa a la enzima de membrana (adenilato ciclasa o fosfolipasa C). **D.** La desfosforilación del GTP a GDP produce, en ausencia de ligando unido al receptor, la reasociación del trómero con retorno del sistema al estado inicial.

mación inactiva de la proteína G. Cuando un receptor unido a su ligando extracelular difunde por el plano de la membrana y toma contacto con la subunidad α de una de las proteínas G, la unión con el GDP se debilita y éste es reemplazado por una molécula de GTP (fig. 7-5). En esta conformación activa (unida al GTP), la subunidad α se disocia de las otras subunidades, difunde por la bicapa y se une y activa a una de dos enzimas principales situadas en la membrana: la *adenilato ciclasa* o la *fosfolipasa C*. Como veremos de inmediato, la adenilato ciclasa es la responsable de la síntesis de AMP cíclico, en tanto que la fosfolipasa C desencadena una reacción más compleja que incluye un aumento del calcio citosólico. Tanto el AMPc como el calcio provocan, por distintos mecanismos, la activación de quinasas y de otras proteínas celulares que culminan con cambios de la respuesta celular al estímulo externo, por lo que son denominados *segundos mensajeros* —el "primer mensajero" es la señal molecular que permanece fuera de la célula— (fig. 7-6).

Es importante que la activación enzimática producida por las proteínas G sea reversible. Esto se cumple porque la vida media del complejo GTP-subunidad α es breve, ya que esta última se comporta como una GTPasa. Ciertas toxinas, como la del bacilo que produce el cólera, activan irreversiblemente a la subunidad α de la proteína G, en este caso de la membrana de los enterocitos, y esto lleva a un incremento incontrolado del AMPc de esas células con pérdida de sodio y agua hacia la

cavidad intestinal, lo que provoca la grave diarrea que es característica de esa enfermedad.

Existen en realidad dos clases funcionales principales de proteínas G: las G_s o estimulantes, que poseen las acciones que acabamos de describir, y las G_i que son inhibitorias; la diferencia reside en las propiedades de las subunidades α .

7-5. La vía de la adenilato ciclasa genera AMP cíclico

La *vía de la adenilato ciclasa* es la responsable de la respuesta celular en la acción de numerosas hormonas (tabla 7-2). Como mencionamos ante-

TABLA 7-2. Algunas respuestas celulares mediadas por AMPc

Respuesta	Señal molecular	Efectores
Taquicardia	Adrenalina	Cardiocytes
Relajación	Adrenalina	Musculatura bronquiolar
Esteroidogénesis	ACTH	Corteza suprarrenal
Secreción de HCl	Histamina	Células parietales
Secreción	FSH	Células de Sertoli
Glucogenólisis	Glucagón	Hepatocitos
Melanogénesis	MSH	Melanocitos
Reabsorción de agua	ADH	Túbulos colectores renales

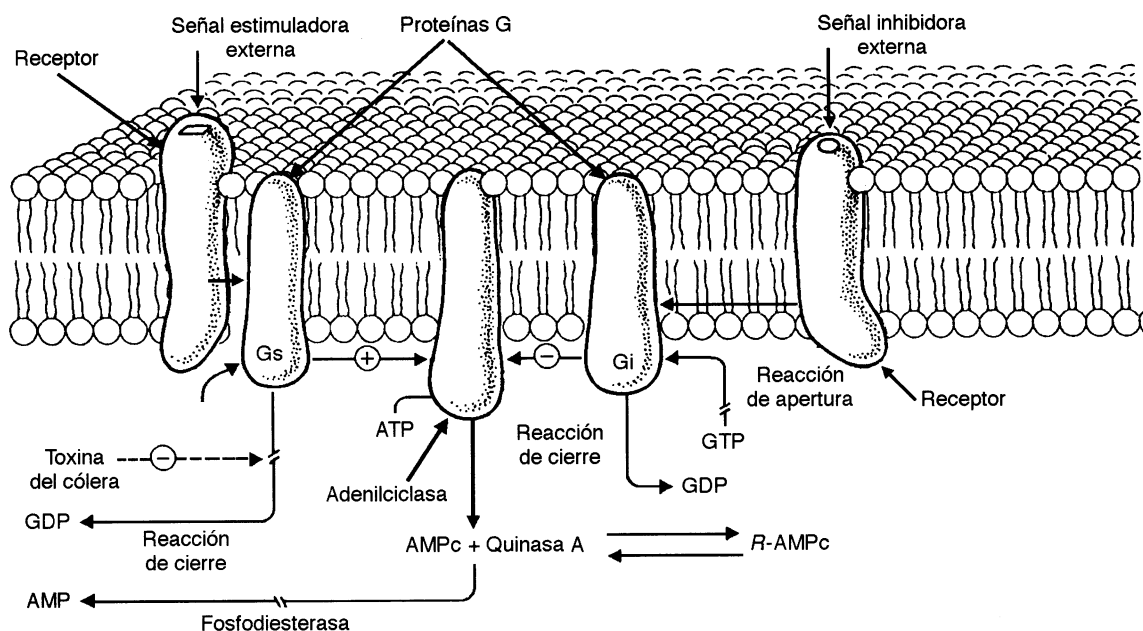


FIG. 7-6. Activación de la quinasa A por el AMPc. En estado inactivo consta de dos subunidades polipeptídicas reguladoras, capaces de unirse al AMPc, y de dos subunidades catalíticas que se activan al disociarse del complejo.

riormente, la activación de la enzima adenilato ciclasa de la membrana celular, mediada por la proteína G activada por el complejo receptor-ligando, se traduce en una rápida generación de AMPc a partir del ATP.

La producción y acumulación intracelular de AMPc en respuesta a una señal externa no es suficiente de por sí para modificar el comportamiento celular. Con la excepción de los canales iónicos regulados por AMPc (como los receptores del olfato, cap. 5-25), la principal acción de este nucleótido cíclico en las células de los vertebrados es la de activar a una quinasa citosólica de proteínas denominada *quinasa A*. Esta quinasa es capaz de fosforilar y activar diferentes sustratos en los distintos

tipos celulares, lo que explica los múltiples efectos que produce el AMPc.

Toda quinasa A en conformación inactiva es un tetrámero que consta de dos subunidades reguladoras asociadas a dos subunidades potencialmente quinásicas. En presencia de AMPc, cada subunidad reguladora se une a dos moléculas del nucleótido, cambia de conformación y deja a las subunidades catalíticas libres para fosforilar proteínas que a su vez activan o regulan múltiples procesos celulares (fig. 7-7).

La reversibilidad de este sistema está asegurada por una *fosfodiesterasa* citosólica que transforma al AMPc en AMP y por un grupo de *fosfatasas de proteínas* con un amplio espectro de especificidad.

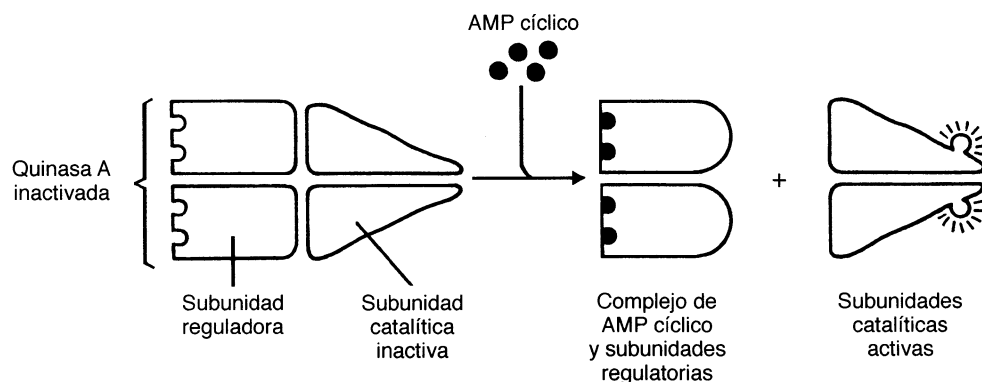


FIG. 7-7. Detalles de las rutas de transducción de las señales externas por la vía del AMP cíclico. (Véase la descripción en el texto.) (Modificado de M. Berridge.)

7-6. La vía de la fosfolipasa C- β es responsable de mecanismos de respuesta celular aún más generalizados y variados que los mediados por AMPc

Se conocen casi treinta receptores para diferentes ligandos que utilizan este sistema. Hacia el final de la cascada de reacciones de esta vía de comunicación también se produce la fosforilación proteica por activación de quinasas, mediante un proceso algo más complejo que el de la vía de la adenilato ciclasa y que incluye un aumento temporario de la concentración citosólica de calcio, por lo cual este elemento es considerado, como ya vimos, un segundo mensajero importante en la señalización intercelular (tabla 7-3).

Recordemos que la concentración intracelular de calcio es de aproximadamente 10^{-7} M, vale decir, unas 4.000 veces menor que en el espacio extracelular. Esta baja concentración es mantenida por la extracción del catión por medio de la bomba de Ca^{2+} (ATPasa Ca^{2+} dependiente) y un sistema de antiporte $\text{Ca}^{2+}\text{-Na}^{+}$ de la membrana plasmática, junto con su acumulación en el llamado *compartimiento secuestrador de calcio* del citoplasma, representado principalmente por elementos del *retículo endoplasmático*, *calciosomas* y secundariamente por las *mitocondrias*.

Como en el caso de la vía de la adenilato ciclasa, el proceso comienza con la activación de los receptores transmembranosos unidos a su ligando. El

complejo receptor-ligando se relaciona entonces con un tipo especial de proteína G, denominada G_q , cuya subunidad α , dissociada del trímero y unida al GTP, actúa sobre una serie de fosfolipasas de la membrana plasmática y las activa.

La más importante de éstas es la *fosfolipasa C- β* , cuyo sustrato es un fosfolípido poco común de la hoja interna de la bicapa lipídica de la membrana, denominado *fosfatidilinositol difosfato* (PIP_2). A partir de la hidrólisis del PIP_2 se generan dos productos, y en este punto la vía se bifurca (fig. 7-8): por un lado queda libre la cabeza polar del fosfolípido, denominada *inositol trifosfato* (IP_3), que difunde al citosol, mientras que el resto de la molécula permanece en la hoja interna de la bicapa como *1,2-diacilglicerol* (DAG).

El IP_3 induce la apertura de canales de calcio en las membranas del compartimiento endomembranoso secuestrador de calcio, de modo que la concentración citosólica de este ion puede aumentar transitoriamente hasta 5×10^{-6} M. Como en el caso del AMPc, el calcio por sí mismo no puede desencadenar una respuesta celular, sino que debe unirse a la *calmodulina*. Esta ubicua proteína es una de las más abundantes en todas las células eucarióticas, donde representa alrededor del 1% de las proteínas totales. Cada molécula posee cuatro sitios de alta afinidad por el calcio, y esta unión origina un cambio conformacional de la calmodulina. En su conformación activada, el complejo cal-

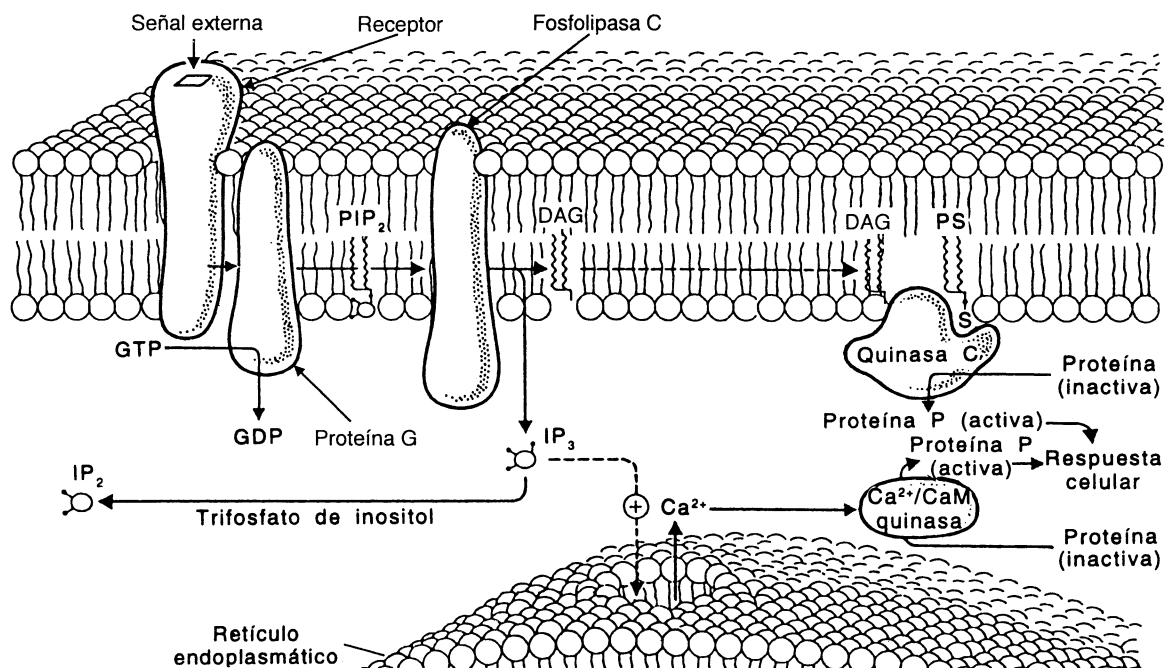


FIG. 7-8. Detalles de las rutas de transducción de las señales externas por la vía del $\text{IP}_3\text{-Ca}^{2+}$ y DAG-quinasa C. (Véase la descripción en el texto.) (Modificado de M. Berridge.)

TABLA 7-3. Algunas respuestas celulares mediadas por Ca^{2+}

Respuesta	Señal molecular	Efector
Secreción	Antígeno-IgE	Mastocito
Reacción cortical	Glucoproteínas del espermatozoide	Ovocito
Contracción	Acetilcolina	Músculo
Secreción	Acetilcolina	Célula acinosa pancreática
Activación	Trombina	Plaqueta
Secreción de HCl	Gastrina	Célula parietal gástrica

modulina-calcio es capaz de unirse a gran número de proteínas y de modificar la actividad de éstas. Entre ellas, existe una gran familia de *proteína quinasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina* (CaM-quinasas) que intervienen en múltiples procesos celulares mediados por el calcio.

El DAG que queda en la bicapa posee también importantes funciones. Actúa sobre la *quinasa C* (PKC) en combinación con el calcio, lo que denota un punto de convergencia con la vía del IP_3 . En su conformación inactiva, la quinasa C es una proteína soluble del citosol. El aumento del calcio produce su asociación a la superficie interna de la membrana plasmática —se transforma en una proteína extrínseca de membrana, cap. 4-3—, donde en contacto con el DAG se activa como quinasa y fosforila diversas proteínas de acuerdo con el tipo celular.

Secundariamente se pueden activar canales de calcio de la membrana plasmática.

En muchos tipos celulares, la acción combinada del Ca^{2+} y del DAG sobre la quinasa C genera un aumento de los procesos secretorios, tal como ocu-

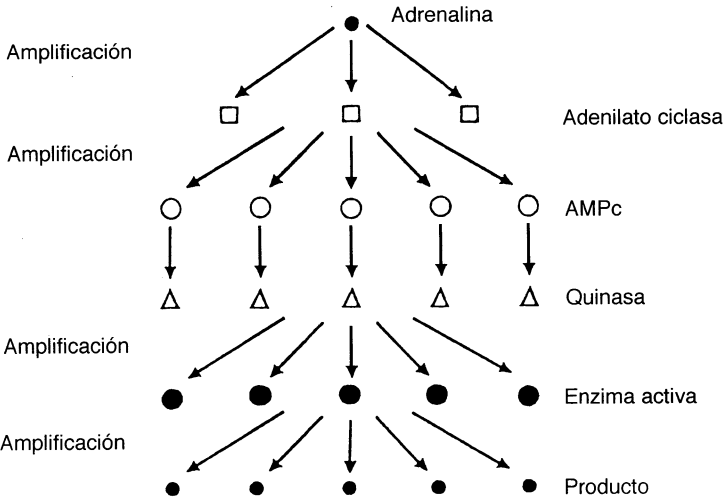
rre en mastocitos, células endocrinas, exocrinas y neuronas; en otras células la quinasa C fosforila a proteínas de la familia MAPK, que a su vez fosforilan y activan a factores de transcripción génica relacionados con la proliferación celular. En el sistema nervioso se fosforilan con intervención de la PKC ciertos canales iónicos, y por este medio se regula la excitabilidad de las membranas neuronales.

7-7. Una función importante de la cascada de quinasas es la amplificación de la señal.

La cadena de fosforilaciones y desfosforilaciones proteicas que acabamos de describir constituye una *cascada* de reacciones, vale decir, una serie de pasos ordenados en cada uno de los cuales las proteínas que intervienen son activadas o inactivadas por los productos del paso anterior y a su vez activan o inactivan a las del paso siguiente. Una de las principales ventajas de estos sistemas de cascadas —que inicialmente podrían parecer innecesariamente complicados a los estudiantes— es que proveen de una enorme amplificación de las señales (fig. 7-9), responsable de que sólo unas pocas moléculas hormonales o factores de crecimiento, por ejemplo, sean capaces de inducir profundos cambios en la expresión génica, la arquitectura citoesquelética, la migración, la proliferación, la diferenciación o el metabolismo celulares.

BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DE LA COMUNICACION NEURAL

Los objetivos de esta sección son introducir las bases celulares y moleculares de un tipo especial de comunicación intercelular que, dada su complejidad e importancia, creemos que merece una



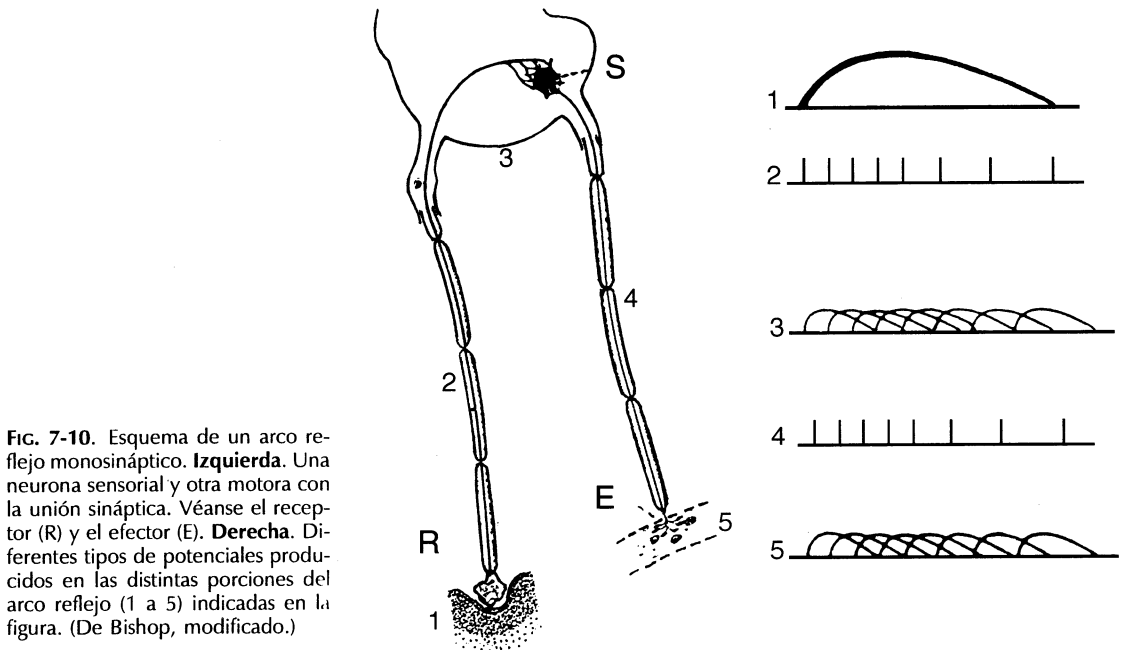


FIG. 7-10. Esquema de un arco reflejo monosináptico. **Izquierda.** Una neurona sensorial y otra motora con la unión sináptica. Véanse el receptor (R) y el efector (E). **Derecha.** Diferentes tipos de potenciales producidos en las distintas porciones del arco reflejo (1 a 5) indicadas en la figura. (De Bishop, modificado.)

atención especial: nos referimos al que establecen las neuronas entre sí y con los receptores o efectores a los que inervan. Analizaremos entonces los fenómenos de la *conducción nerviosa* y la *transmisión sináptica*.

Una de las funciones más importantes de los organismos vivos es la de reaccionar ante las modificaciones del medio, estímulos que generalmente originan una respuesta. En su sentido más amplio, esta propiedad se denomina *irritabilidad*. Por ejemplo, un protozoo (organismo unicelular) puede reaccionar ante diferentes estímulos, como por ejemplo los cambios de temperatura y luminosidad o la presencia de una partícula alimentaria, con una mecánica expresada por el movimiento ciliar, el amebioideo, etc. Los vegetales reaccionan a los cambios ambientales por medio de respuestas lentas que producen un crecimiento diferencial llamado tropismo.

La irritabilidad alcanza su máximo desarrollo en animales en los que células particulares del tejido nervioso están diferenciadas para responder rápida y eficazmente a los distintos estímulos. En estos organismos los *receptores* fisiológicos están constituidos por células o por la terminación distal de ciertas neuronas especializadas para recibir determinado estímulo. Por ejemplo, los receptores a la luz, el tacto, el gusto, la presión, el calor, el frío, etc., se caracterizan por su gran sensibilidad a los estímulos específicos correspondientes.

La respuesta al estímulo es de naturaleza variable en los animales. Estos diferentes tipos de respuestas se manifiestan en tejidos especializados (músculos, glándulas, placas eléctricas, órganos luminosos) llama-

dos *efectores*, que se encuentran bajo el control de neuronas eferentes.

El mecanismo más simple de acción nerviosa está representado por el arco reflejo monosináptico, que consiste en un circuito neuronal formado por dos células nerviosas o neuronas. Una de ellas es sensorial (aférente) y posee un receptor en una terminación para recibir el estímulo. Por el extremo opuesto realiza un contacto especial (sinapsis) con una neurona eferente (motora), la cual a su vez actúa sobre el efector (por ejemplo, el músculo).

La figura 7-10 ilustra esquemáticamente de qué modo la información recibida a nivel del receptor es conducida a lo largo de la neurona sensorial y después transmitida por la *sinapsis*. Se observa que una nueva onda de información parte de la segunda neurona y llega finalmente al efector, donde es elaborada la respuesta final. En los nervios y el músculo la información se propaga por la superficie de la membrana mediante variaciones transitorias del *potencial de reposo*. Este cambio origina una onda de excitación que se desplaza a lo largo de la superficie. En la célula nerviosa, al potencial propagado también se lo conoce como *impulso nervioso*.

La transmisión sináptica puede ser eléctrica, por medio de uniones de tipo nexo (cap. 6-5), pero con mayor frecuencia es química. La *sinapsis química* tiene una estructura compleja, tanto en la membrana como dentro de las terminaciones, cuyos componentes principales son las *vesículas sinápticas*, las verdaderas unidades cuánticas de la transmisión. En términos generales, en las sinapsis químicas tiene lugar un proceso localizado de *neuro-*

secreción, similar a la producción de otros neurohumores. La transmisión de la comunicación celular a través del espacio sináptico (*transmisión sináptica*) es el resultado de la interacción entre el neurotransmisor y proteínas receptoras específicas que se encuentran en la membrana postsináptica neuronal. Esta interacción produce una translocación de iones y, en algunos casos, la producción de los segundos mensajeros AMPc o GMPc.

TRANSMISION SINAPTICA Y ESTRUCTURA DE LA SINAPSIS

Los conocimientos iniciales acerca de la sinapsis o los contactos sinápticos provienen de los hallazgos realizados a fines del siglo XIX y comienzos del actual sobre la organización morfológica y fisiológica del sistema nervioso.

La teoría neuronal, sostenida principalmente por Cajal, se basaba en el supuesto de que la interacción funcional de las células nerviosas ocurría por medio de contigüidades o contactos funcionales.

Sherrington, en 1897, introdujo el nombre de sinapsis para explicar las propiedades especiales del arco reflejo, que según él dependían de contactos funcionales entre las neuronas. Atribuyó a la sinapsis una acción de válvula, tendiente a lograr que los impulsos sean transmitidos en una sola dirección (fig. 7-10). Descubrió algunas de las propiedades fundamentales de la sinapsis, como el retardo sináptico —es decir, el retardo que experimenta el impulso al atravesar la unión—, la fatigabilidad de la sinapsis y su mayor sensibilidad a la merma de oxígeno y a los anestésicos. También señaló que muchas sinapsis situadas sobre la superficie de una neurona motora podían integrar su acción, y que mientras algunas tenían acción excitadora, otras eran inhibitorias y antagonistas de las primeras.

La sinapsis engloba a todas las regiones “anatómicamente diferenciadas y funcionalmente especializadas para la transmisión de excitaciones e inhibiciones de un elemento al siguiente en una dirección no recíproca”.

Una definición más moderna de sinapsis debería incluir también la existencia de una organización submicroscópica compleja entre ambas partes de la unión presináptica y postsináptica, y de un mecanismo específico neuroquímico en el que están comprendidos los transmisores, las proteínas receptoras, las enzimas de síntesis e hidrolíticas, etcétera.

Tomando como referencia el esquema de la figura 7-10, se aprecia claramente que el principal problema de la transmisión sináptica consiste en descubrir el mecanismo molecular por el cual la información conducida por una neurona es transferida a la siguiente.

7-8. La transmisión de un impulso nervioso es mediada principalmente por un mecanismo químico

Du Bois Reymond (1877) fue el primero en sugerir que la transmisión podía ser de naturaleza química o eléctrica, y si bien posteriormente se observaron ambos mecanismos, la sinapsis química es por mucho la más frecuente, tanto en el sistema nervioso periférico como en el central.

La *transmisión eléctrica* fue evidenciada por primera vez en la sinapsis gigante del ganglio abdominal del cangrejo de río y luego en varios otros casos. En este tipo de sinapsis, el contacto actúa como un eficaz rectificador eléctrico al permitir que la corriente pase con relativa facilidad desde el elemento presináptico al postsináptico, pero no en dirección inversa. La corriente de acción del impulso nervioso que llega pasa sin retardo y despolariza y excita directamente a la neurona postsináptica. Aquí, la transmisión unidireccional se debe a la resistencia eléctrica —que actúa como una válvula— de las membranas sinápticas puestas en contacto.

Además de la transmisión eléctrica unidireccional, hay regiones de membranas neuronales adyacentes en las cuales existen uniones con hendidura (tipo nexos, cap. 6-5) que permiten el acoplamiento electrónico. En este caso el flujo eléctrico es bidireccional.

La *transmisión química* supone que un mediador químico específico es sintetizado y se acumula en la terminación nerviosa, y que luego es liberado por el impulso nervioso.

En 1904, Elliot sugirió que los nervios simpáticos actúan por medio de la liberación de adrenalina a nivel de las uniones con el músculo liso. Más tarde, von Euler pudo comprobar que el verdadero transmisor adrenérgico era la noradrenalina. Los estudios de Dixon (1906) y especialmente los de Dale (1914) confirmaron la transmisión química en el sistema parasimpático, la que fue probada por Loewi (1921) en el corazón. A partir de entonces se demostró que la acetilcolina actúa en los ganglios simpáticos, en la placa mioneural y en numerosas sinapsis centrales.

Los estudios sobre la transmisión sináptica química han revelado que las sinapsis son sitios donde tiene lugar un mecanismo de transducción mediante el cual las señales eléctricas se convierten en señales químicas y éstas nuevamente en señales eléctricas. Más adelante se verá que a nivel de las terminaciones nerviosas se producen sustancias activas de bajo peso molecular (acetilcolina, noradrenalina, dopamina, glutamato, ácido γ -aminobutírico, etc.), que están contenidas dentro de las vesículas sinápticas en cantidades multimoleculares. Estas sus-

tancias, llamadas *neurotransmisores*, son liberadas cuando llega el impulso nervioso al terminal. El transmisor interactúa a su vez con una proteína receptora específica presente en la membrana post-sináptica, y como consecuencia ocurre un cambio en la permeabilidad a ciertos iones que origina el potencial sináptico en la célula postsináptica.

En las secciones siguientes veremos que el principio básico de la comunicación en el sistema nervioso consiste en el cambio sucesivo, en cada sinapsis, de una señal eléctrica en un mecanismo químico y de nuevo en otra señal eléctrica.

7-9. La ultraestructura de la sinapsis sugiere la existencia de muchos tipos de contactos funcionales

El descubrimiento de las *vesículas sinápticas* por De Robertis y Bennett y las características que presentan las membranas sinápticas bajo el microscopio electrónico sirvieron para reconocer diversos tipos de sinapsis.

A nivel de la unión sináptica ambas membranas aparecen más gruesas y densas. La hendidura o espacio sináptico, situada entre las membranas sinápticas, está ocupada por un material denso y puede mostrar un sistema de finos filamentos inter-sinápticos (constituídos por CAMs) de unos 5 nm que unen ambas membranas (fig. 7-11).

Hay otro sistema de filamentos que penetra a distancia variable dentro de la célula postsináptica. Es el llamado *retículo subsináptico* o *densidad post-sináptica*.

La posición de las vesículas sinápticas y de las densidades postsinápticas sugirió la posible polaridad funcional de las sinapsis y llevó a reconocer una serie de contactos que antes no podían demos-

trarse con los métodos histológicos. Pueden establecerse contactos funcionales entre cualquier parte de las membranas neuronales; en efecto, las únicas porciones de la neurona que nunca hacen sinapsis son los segmentos de fibra nerviosa cubiertos de mielina (internodos). Además, la salida del neurotransmisor no parece estar restringida al terminal axónico, y se ha sugerido que las dendritas pueden ser también sitios de liberación.

Desde el punto de vista morfológico es posible reconocer los siguientes *tipos de sinapsis*:

a) *Sinapsis axodendríticas* (fig. 7-12, A), las cuales pueden establecerse directamente sobre la dendrita, aunque en la mayoría de los casos lo hacen por intermedio de una espina (sinapsis axoespinosa).

b) *Sinapsis axosomáticas*, que terminan sobre el pericarion. Algunas pueden hacerlo sobre el cono inicial del axón; éstas a veces se denominan sinapsis del segmento inicial, y se piensa que ejercen una acción inhibitoria sobre la neurona. Tales sinapsis son importantes porque están situadas en un sitio estratégico, donde pueden influir en el disparo del impulso nervioso.

c) *Sinapsis axoaxónicas*, en las que un terminal nervioso se pone en contacto con otro (fig. 7-12, D). Este tipo de sinapsis parece estar involucrado en la inhibición presináptica, dado que por su acción puede reducir la salida del neurotransmisor.

d) *Sinapsis seriada*, en cual una de las partes de las sinapsis axoaxónicas es presináptica en una sinapsis y postsináptica en la otra.

e) *Sinapsis recíproca*, en que una prolongación neuronal puede ser presináptica en un punto y postsináptica en otro (fig. 7-12, E).

f) *Sinapsis somatodendríticas*, en que el pericarion puede ponerse en contacto con una dendrita (fig. 7-12, C).

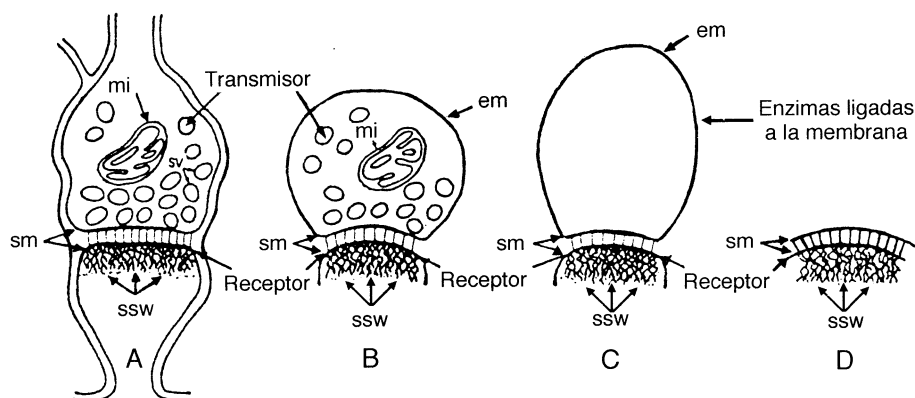


FIG. 7-11. Esquema que muestra la disección sistemática de la región sináptica lograda con el uso de métodos de fraccionamiento celular. A. Sinapsis típica de la corteza cerebral que muestra: mi, mitocondria; sv, vesículas sinápticas; sm, membranas sinápticas; ssw, red subsináptica. B. Terminación nerviosa aislada. em, membrana del terminal. C. Después del shock osmótico, sólo queda la membrana del terminal. D. Después del tratamiento con un detergente suave, sólo permanece el complejo de unión. (De E. De Robertis [1971].)

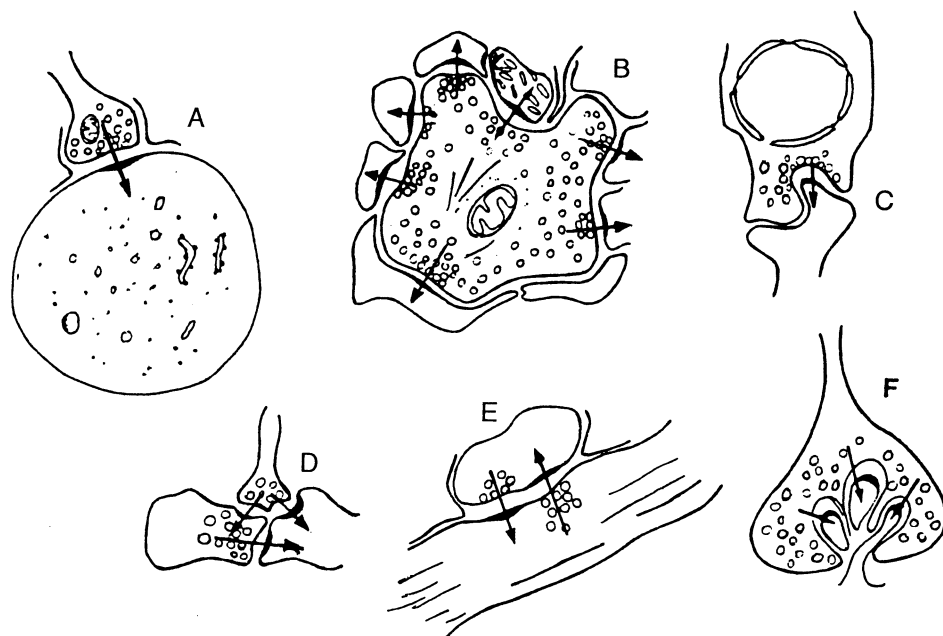


FIG. 7-12. Representación esquemática de diferentes tipos de sinapsis. En cada caso la polaridad se indica por una flecha. **A.** Axodendrítica. **B.** Glomerular, con varias sinapsis axodendríticas y una axoaxónica. **C.** Somatodendrítica. **D.** Tríada, en la cual una sinapsis termina sobre otra y con una dendrita. **E.** Recíproca, que puede involucrar dos dendritas (sinapsis dendrodendrítica). **F.** Invaginada. En cada caso la polaridad está determinada por las vesículas sinápticas y la densidad postsináptica. (Cortesía de J. Pecci Saavedra, O. Vilar y A. Pellegrino de Iraldi.)

g) *Sinapsis dendrodendríticas*, que se encuentran en diversas regiones del sistema nervioso central y en las cuales las dendritas tienen grupos de vesículas sinápticas opuestas a otras dendritas; algunos de estos contactos pueden ser de tipo recíproco (fig. 7-12, E).

Estos y otros tipos más complejos de sinapsis, como las *glomerulares* (fig. 7-12, B), la *tríada* (fig. 7-12, D) y las *invaginadas* (fig. 7-12, F), sugieren que las interacciones entre las neuronas son mucho más complejas de lo que antes se imaginaba, y que todas las regiones de la membrana neuronal pueden tener una función sináptica.

7-10. La membrana presináptica muestra proyecciones especiales en las zonas activas

Desde los primeros estudios de microscopía electrónica de la sinapsis se ha reconocido que las vesículas sinápticas tienden a agruparse sobre regiones especiales de la membrana presináptica, que fueron denominadas *zonas activas*. En éstas hay proyecciones de material denso que entablan una relación especial con las vesículas.

En las sinapsis centrales las proyecciones presinápticas tienen un diámetro de 50 nm y presentan una disposición hexagonal. En la figura 7-13 se observa que estas proyecciones forman una especie

de retículo, en cuyos espacios se acomodan las vesículas sinápticas que se adhieren a la membrana. En los estudios de criofractura la hoja interna de la membrana presináptica (cara P) muestra acúmulos de partículas de 10 nm. Sin embargo, la característica más saliente es la presencia de pequeñas depresiones en la cara P que corresponden a protuberancias en la cara E (hoja externa). Estas depresiones se disponen en forma geométrica y corresponden a los sitios de unión de las vesículas (fig. 7-13).

En la unión neuromuscular de los vertebrados, las proyecciones presinápticas aparecen como bandas que corren en forma perpendicular al eje del terminal nervioso (fig. 7-14). En el lado postsináptico, opuesto a estas bandas, se encuentran los pliegues de la membrana postsináptica.

Aunque la mayoría de las vesículas sinápticas de la unión neuromuscular están libres en el terminal, en cierta proporción se unen a la membrana presináptica. Lo hacen a ambos lados de las proyecciones antes mencionadas.

Mediante congelación-grabado, la membrana presináptica muestra una doble hilera de partículas de 10 nm dispuestas en paralelo, con las proyecciones densas que llevan las vesículas. Según veremos, estas grandes partículas intramembranas podrían corresponder a los canales de calcio (fig. 7-24).

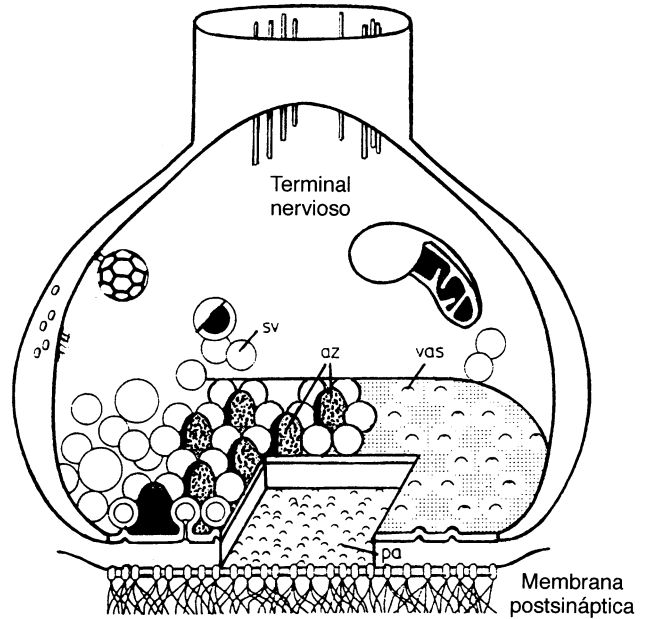


FIG. 7-13. Esquema de una sinapsis central. az, Zona activa que muestra la proyección presináptica rodeada por vesículas unidas a la membrana postsináptica que se encuentran en la región opuesta a las zonas activas; sv, vesículas sinápticas. (Cortesía de K. Akert.)

A pesar de las diferencias geométricas —hexagonales en las sinapsis centrales y en bandas paralelas en la unión mioneural—, las proyecciones son esencialmente semejantes en ambas sinapsis. Sin embargo, una sinapsis central puede acomodar ocho veces más vesículas en la vecindad de la

membrana. En las sinapsis de los fotorreceptores hay proyecciones presinápticas especiales, las cintas sinápticas, que aparecen como bandas aplanadas donde convergen gran número de vesículas.

La función de estos distintos tipos de proyecciones es aún desconocida. Es posible, sin embargo,

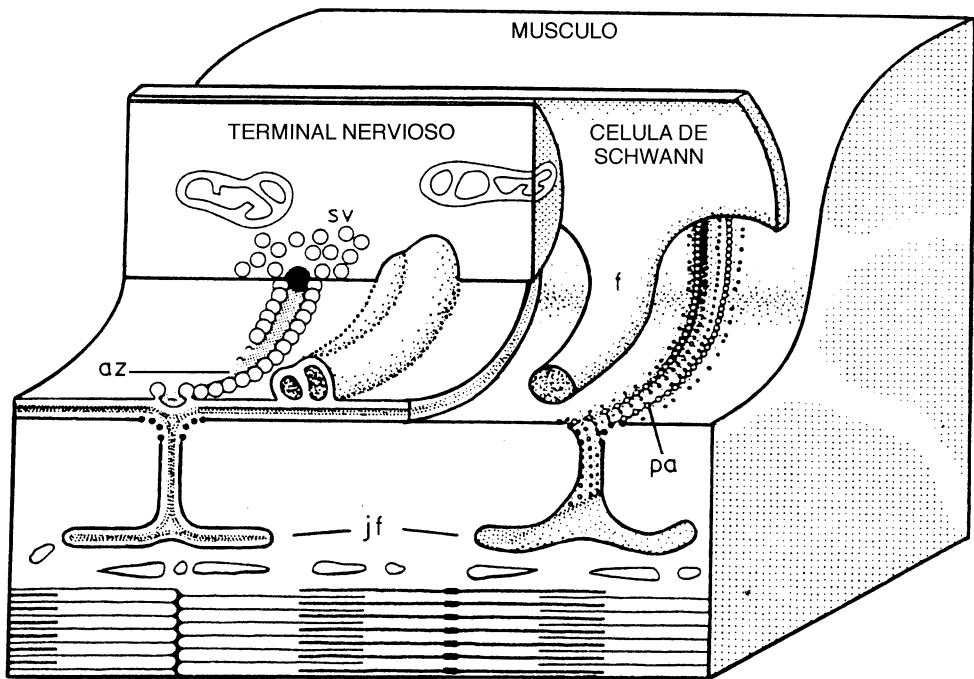


FIG. 7-14. Esquema que muestra las principales características estructurales de la unión mioneural de la rana. az, zona activa donde se adhieren las vesículas sinápticas a ambos lados de la banda presináptica; pa, partículas de la membrana postsináptica que pueden corresponder a receptores colinérgicos; sv, vesículas sinápticas; jf, pliegues postsinápticos; f, prolongación de la célula de Schwann. En el lado derecho de la figura se ha separado la membrana presináptica. (Cortesía de K. Akert.)

que actúen como “guías” en el transporte de las vesículas hacia los sitios de liberación. Esta posibilidad se ve respaldada por el hallazgo de actina y miosina dentro del terminal, proteínas que se asocian con las vesículas y la membrana presináptica. Esas proteínas pueden proveer la fuerza capaz de traccionar a las vesículas hacia la membrana presináptica.

7-11. La membrana postsináptica tiene una organización macromolecular compleja

La criofractura y la coloración negativa han permitido revelar una organización macromolecular fina en la membrana postsináptica.

En la unión mioneural, en la entrada de los pliegues postsinápticos, hay abundantes partículas de 8,5 nm, con una densidad de $9.000/\mu\text{m}^2$. En la figura 7-14 se aprecia que tales partículas se hallan en regiones enfrentadas con las zonas presinápticas activas.

En estas regiones se encuentra el *receptor colinérgico*. Usando α -bungarotoxina- ^3H , una toxina que se une específicamente al receptor colinérgico, se observa que se localiza en esta región de la membrana postsináptica. En la unión mioneural se piensa que las partículas representan complejos de receptores canales y que hacen saliencia en el espacio sináptico. En cambio, la *acetilcolinesterasa*, enzima que hidroliza a la acetilcolina, se distribuye más ampliamente dentro del pliegue postsináptico.

En la membrana postsináptica de la electroplaca de *Torpedo*, las partículas tienen una densidad de 10.000 a $15.000/\mu\text{m}^2$, con una disposición hexagonal.

Es notable la disposición tan exacta que existe entre los receptores colinérgicos en la entrada de

los pliegues y las zonas activas donde están adheridas las vesículas sinápticas. Se puede pensar que esta organización asegura que el neurotransmisor secretado llegue rápidamente a los receptores que son sus sitios de acción.

En sinapsis centrales se han observado partículas de 8-13 nm en agregados situados aproximadamente en regiones opuestas a los sitios activos (fig. 7-13).

7-12. La transmisión sináptica puede ser excitadora o inhibitoria

Los estudios fisiológicos sobre la transmisión sináptica se perfeccionaron en gran parte con el empleo de microelectrodos que pueden implantarse cerca de la región sináptica o, intracelularmente, en las neuronas presináptica y postsináptica.

Los registros intracelulares en células nerviosas de grandes dimensiones (neuronas motoras, células piramidales, células ganglionares de invertebrados, etc.) permitieron observar que la llegada del impulso nervioso presináptico origina un potencial sináptico local.

Los *potenciales sinápticos*, así como los *potenciales generadores*, son graduados y no se propagan. Se extienden electrónicamente solo por una corta distancia, en la cual su amplitud se reduce.

Un experimento típico es el que ilustra la figura 7-15, donde intervienen dos células ganglionares de *Aplysia* (un molusco marino), una de las cuales actúa sinápticamente (P) sobre la otra (F). En la neurona P se implantan dos microelectrodos, que se emplean para estimulación (St) y registro (R), respectivamente. En la neurona F se coloca un microelectrodo (R) para registrar el potencial sináptico. Se pueden encontrar dos tipos principales de

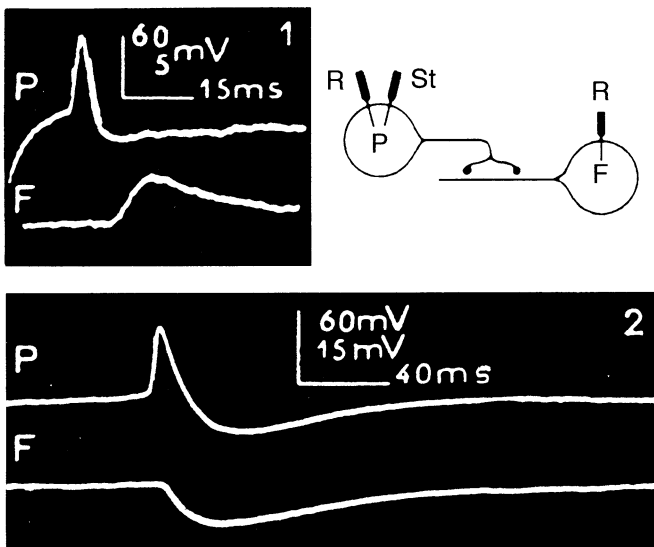


FIG. 7-15. Esquema del experimento en dos células ganglionares de *Aplysia* que están relacionadas por sinapsis. (Véase la descripción en el texto.) 1. Respuesta excitatoria con despolarización de la membrana en F, después de la llegada del potencial de acción a partir de P. 2. Respuesta inhibitoria con hiperpolarización de la membrana en F, después de la llegada del potencial de acción a partir de P. (Cortesía de L. Tauc y H. M. Gerschenfeld.)

células P: unas producen potenciales sinápticos excitatorios en la célula F (1) y otras un potencial postsináptico inhibitorio (2).

Los potenciales excitatorios despolarizan la membrana postsináptica hasta que, al llegar a cierto nivel crítico, inducen a la neurona a descargar un impulso. El potencial postsináptico excitatorio (PPSE) se debe a la acción del transmisor liberado por la terminación (fig. 7-15, 1), que produce un cambio en la permeabilidad de la membrana postsináptica que permite el paso de iones pequeños como Na^+ , K^+ y Cl^- .

Del mismo modo, las sinapsis inhibitorias influyen sobre la membrana postsináptica. En este caso tiene lugar un aumento transitorio del potencial de membrana, denominado potencial postsináptico inhibitorio (PPSI) (fig. 7-15, 2). El efecto hiperpolarizante provoca una depresión de la excitabilidad neuronal y, por consiguiente, ejerce una acción inhibitoria.

Las acciones de excitación y de inhibición no dependen exclusivamente del tipo de sustancia transmisora. Así, la acetilcolina es excitadora en la unión mioneural, en el ganglio simpático y en otras localizaciones, pero es inhibitoria en el corazón de los vertebrados y reduce la frecuencia de la contracción.

La inyección de acetilcolina en las células de *Aplysia* (fig. 7-16) tiene un efecto sináptico excitatorio en algunas de ellas, ya que produce despolarización y aumento de la frecuencia de descargas (1) o únicamente una despolarización sin descargas (2). En otras células, el mismo tratamiento causa hiperpolarización e inhibición de las descargas espontáneas (3).

Estos fenómenos indican que la naturaleza de una sinapsis se basa particularmente en el receptor, es decir, en la reactividad química de la membrana de la neurona postsináptica y del canal asociado.

El empleo de registros intracelulares ha contribuido enormemente a dilucidar algunos de los mecanismos básicos por medio de los cuales el código de señales es transmitido de una célula a otra. Todos los potenciales sinápticos de diferentes terminaciones excitadoras o inhibitorias que se descargan sobre una neurona se suman algebraicamente, y modifican las propiedades eléctricas de la membrana en una zona crítica de la célula con bajo umbral excitador. En esta región, denominada "marcapaso", que en la neurona motora se localiza a nivel del segmento inicial del axón, tiene lugar la descarga de nuevos impulsos. En este sentido, la neurona actúa en forma semejante a un computador analógico, integrando todos los mensajes excitatorios e inhibitorios que llegan a su superficie antes de decidir o no el disparo de un nuevo impulso nervioso.

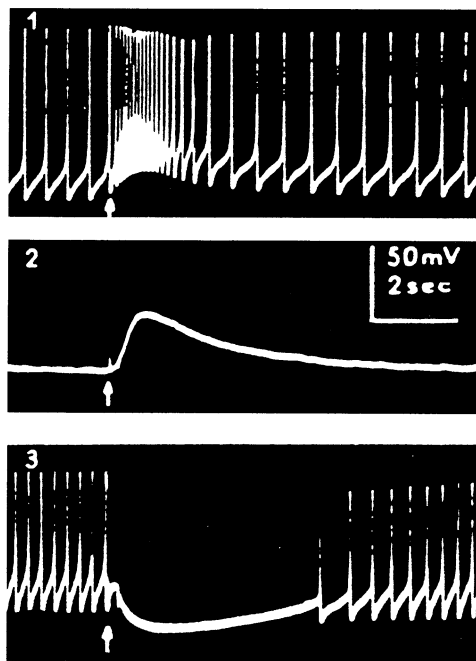


Fig. 7-16. 1. Registro intracelular de una neurona de *Aplysia* (fig. 7-15) que produce descargas espontáneas. En el sitio indicado por la flecha se agrega acetilcolina, que causa despolarización y aumento de la frecuencia de descarga (sinapsis excitatoria). 2. El mismo experimento en una neurona sin descarga. Sólo ocurre una despolarización (potencial sináptico). 3. En esta neurona la acción de la acetilcolina induce la hiperpolarización y la inhibición de las descargas espontáneas. (Cortesía de L. Tauc y H. M. Gerschenfeld.)

7-13. Varios miles de sinapsis pueden hacer contacto con una neurona

Los estudios morfológicos realizados con el microscopio óptico revelaron la considerable variación de forma, tamaño y distribución de las sinapsis en las diferentes regiones del sistema nervioso central y periférico.

Clásicamente las sinapsis se clasifican en axosomáticas, axodendríticas y axoaxónicas, de acuerdo con las relaciones que contraen las terminaciones con los componentes postsinápticos. Estas terminaciones presentan diversas formas (de botón, de clava, de cáliz, etc.).

El número de sinapsis que terminan sobre el cuerpo neuronal y las dendritas varía considerablemente. En la sinapsis caliciforme del ganglio ciliar hay una enorme sinapsis única por célula. Una gran motoneurona puede recibir 10.000 contactos sinápticos; una neurona piramidal de la corteza cerebral puede tener 40.000 contactos sinápticos, y una gran célula de Purkinje del cerebelo puede recibir 200.000. Estas cifras dan una idea de la extraordinaria complejidad del sistema nervioso.

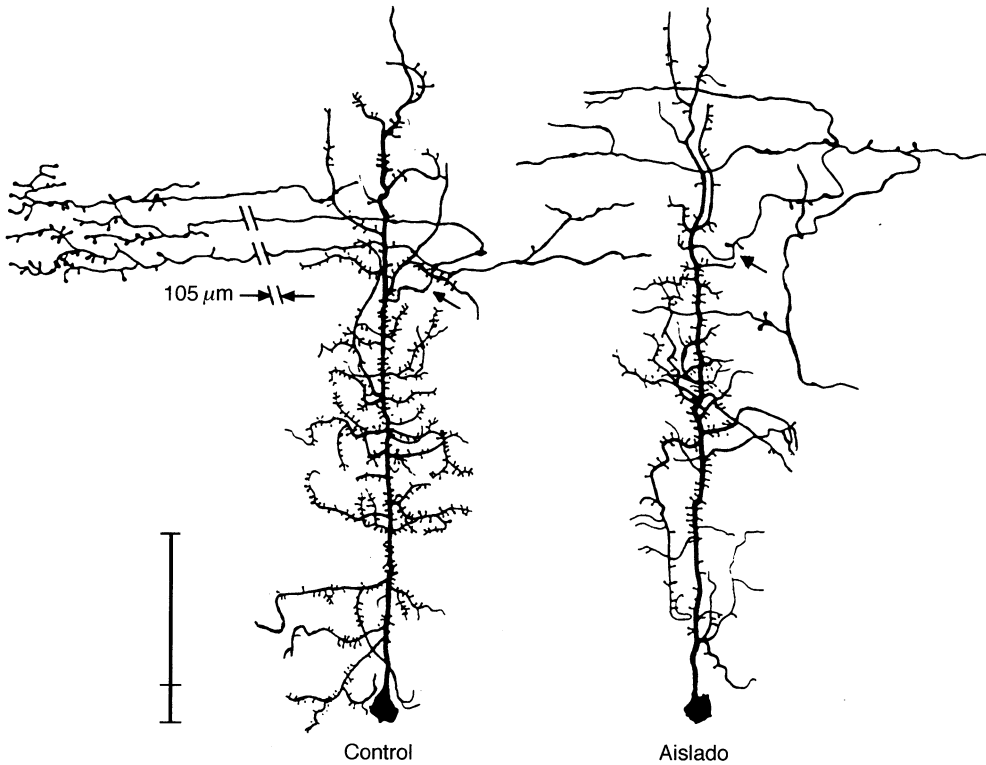


FIG. 7-17. Interneuronas del tectum óptico del pez joya, coloreadas con el método de Golgi. En el testigo se observan abundantes dendritas y espinas. En el pez aislado hay una reducción de las dendritas y del número de espinas; éstas son más largas y finas que en el testigo. (Cortesía de R. G. Goss y A. Globus [1978].)

Esta enorme cantidad de sinapsis trae información de muchas neuronas, algunas de las cuales pueden tener un efecto excitatorio y otras inhibitorio. Por lo tanto, la neurona es un verdadero centro de computación donde se integra toda la información y a partir de la cual se originan nuevos impulsos.

7-14. El número de sinapsis está relacionado con el de espinas dendríticas

En general, el número de sinapsis guarda relación con el número y la longitud de las dendritas sobre las cuales se produce la mayoría de los contactos. Las dendritas poseen finas excrecencias sobre su superficie, llamadas *espinas*, donde se realizan los contactos sinápticos.

Una espina típica es pedunculada, tiene un diámetro de 0,5 a 2,0 μm en el extremo y presenta un eje estrecho de 0,5 a 1 μm de largo.

El número y el tamaño de las espinas dendríticas pueden estudiarse fácilmente en las neuronas teñidas con el método de Golgi (fig. 7-17). Tales estudios son importantes en condiciones patológicas, ya que la reducción del número de espinas puede indicar la degeneración de los axones y de las terminaciones aferentes.

El cerebro se forma embriológicamente por completo, en todos sus detalles, antes de ser usado, y su formación se halla bajo control genético, pero no obstante esto su funcionamiento puede hacerle experimentar delicados cambios de microestructura a nivel sináptico. Puede modificarse el número y el tamaño de las espinas y esto guarda relación con la plasticidad del sistema nervioso central. Los contactos sinápticos no son completamente estables y pueden cambiar no solo durante el desarrollo, sino también por influencia de los impulsos que llegan a una neurona. Así, la privación sensorial altera y reduce el número de espinas.

Se observó que los peces criados en tanques comunitarios tienen mayor número de ramas dendríticas y espinas en las interneuronas de las capas profundas del tectum, en comparación con peces criados sin contacto visual y táctil con otros de la misma especie (fig. 7-17). Los testigos no solo presentan más espinas, sino que en éstas el tallo es más corto. Tales hallazgos sugieren que la estimulación social induce la formación y el ensanchamiento de las espinas. Estos cambios plásticos pueden tener profunda influencia en la eficacia de la transmisión sináptica y, por lo tanto, pueden estar relacionados con los procesos de aprendizaje.

De hecho, una de las teorías del aprendizaje de mayor aceptación se basa en el crecimiento y la ramificación de las sinapsis espinosas. Este crecimiento sináptico implica el estímulo de la síntesis de proteínas y la transcripción de ARN; la inhibición de estos procesos puede anular el aprendizaje y la memoria de largo plazo.

VESICULAS SINAPTICAS Y LIBERACION CUANTICA DEL NEUROTRANSMISOR

Desde su descubrimiento, las vesículas sinápticas fueron interpretadas como estructuras involucradas en la acumulación, el transporte y la liberación de

los neurotransmisores. Luego de la demostración de la naturaleza cuántica de la transmisión sináptica por Fatt y Katz (1952), De Robertis y Bennett, en 1954, sugirieron que las vesículas eran los sitios de acumulación del neurotransmisor.

Esto fue demostrado en 1962 con el aislamiento de las vesículas a partir de sinapsis centrales y la demostración de que la acetilcolina se acumula en esta fracción subcelular. Después se comprobó que otros transmisores también se localizaban en las vesículas (De Robertis, 1964) y se pudieron aislar poblaciones puras de vesículas a partir de neuronas colinérgicas y adrenérgicas.

En esta sección estudiaremos la morfología y la estructura de las vesículas sinápticas en relación con su posible papel en la transmisión sináptica.

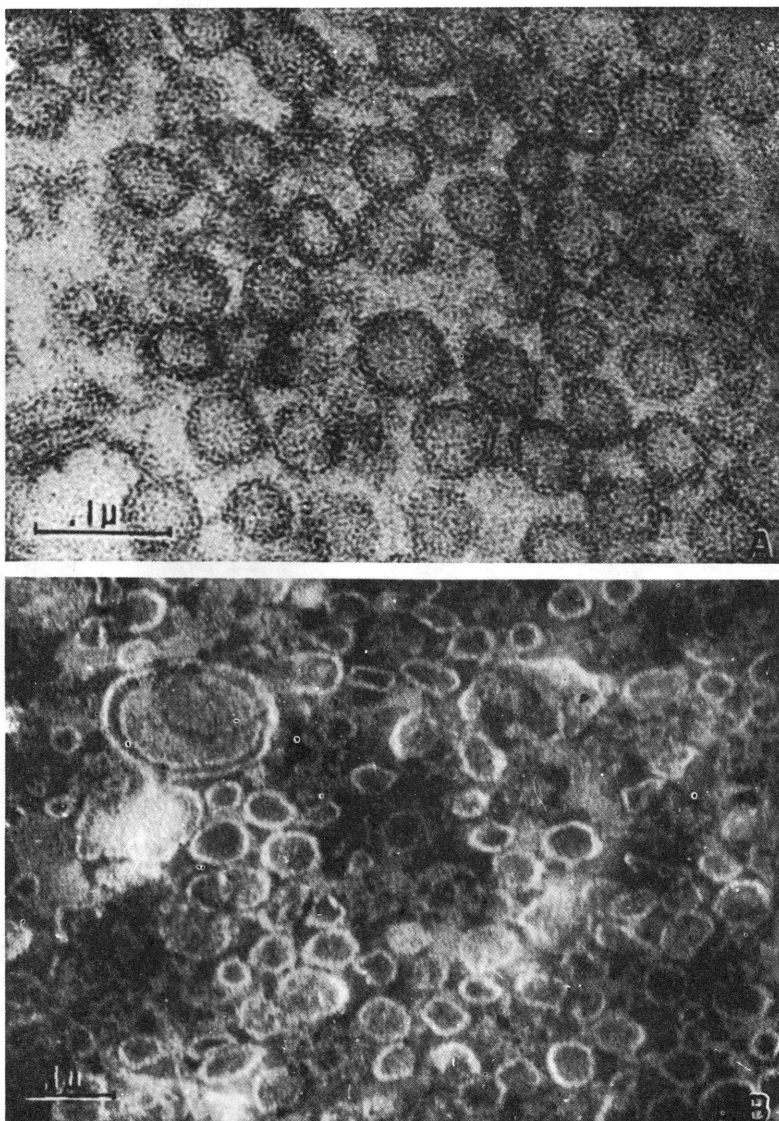


FIG. 7-18. A. Fotomicrografía electrónica, con gran aumento, de las vesículas sinápticas del hipotálamo de la rata. Se aprecia la ultraestructura de la membrana vesicular. 180.000 $\times$. B. Vesículas sinápticas aisladas del cerebro de la rata después del shock osmótico de la fracción mitocondrial. Coloración negativa con fosfortungstato. 120.000 $\times$. (De E. De Robertis et al. [1963].)

7-15. Por su morfología y citoquímica se pueden reconocer varios tipos de vesículas sinápticas

Morfológicamente se pueden distinguir cuatro tipos de vesículas sinápticas:

1. *Vesículas claras esféricas*. Tienen un diámetro de 40 a 50 nm y una membrana limitante de 4 a 5 nm (fig. 7-18). Son características de las sinapsis colinérgicas periféricas y de las *glutaminérgicas*, que son más frecuentes en el sistema nervioso central. Se distribuyen más o menos uniformemente por el axoplasma de la terminación, aunque cierta proporción hace contacto con la membrana pre-sináptica a nivel de los sitios activos. Como se dijo antes, en la placa mioneural estos sitios activos están localizados a ambos lados de las bandas pre-sinápticas (fig. 7-14). En esta sinapsis hay alrededor de 1.000 vesículas por μm^3 y un total de 3×10^5 . De ellas, solo el 20% se hallan cerca de la membrana, listas para liberar el transmisor.

2. *Vesículas granulares grandes*. Se observan tanto en sinapsis centrales como periféricas (fig. 7-19). En sinapsis colinérgicas y adrenérgicas periféricas hay una pequeña proporción de vesículas grandes que tienen un centro denso. Se ha pro-

puesto que estas vesículas podrían contener *neuropeptidos*.

3. *Vesículas elípticas o aplanadas claras*. Se observan en ciertas sinapsis centrales y periféricas (fig. 7-19). Han sido relacionadas con la función inhibitoria, ya que contienen el neurotransmisor inhibitorio γ -aminobutirato (GABA).

4. *Pequeñas vesículas granulares*. Descriptas por primera vez en 1961 por De Robertis y Pellegrino de Iraldi, tienen un diámetro de 40 a 60 nm y contienen un núcleo denso y una región más clara o matriz. Utilizando agentes farmacológicos que liberan o aumentan la concentración de catecolaminas o empleando técnicas citoquímicas, se demostró que contienen *noradrenalina* y, en el caso de los nervios pineales, también *5-hidroxitriptamina (serotonina)*. Recientemente se propuso un modelo de dos compartimientos para estas vesículas: a) uno más laxamente unido, de fácil liberación, en el compartimiento externo o matriz, y b) uno firmemente unido, más resistente, en el compartimiento del núcleo (fig. 7-20).

Adicionalmente se encuentran *vesículas con cubierta*, en pequeña proporción en sinapsis centrales, pero no contienen neurotransmisor sino que se

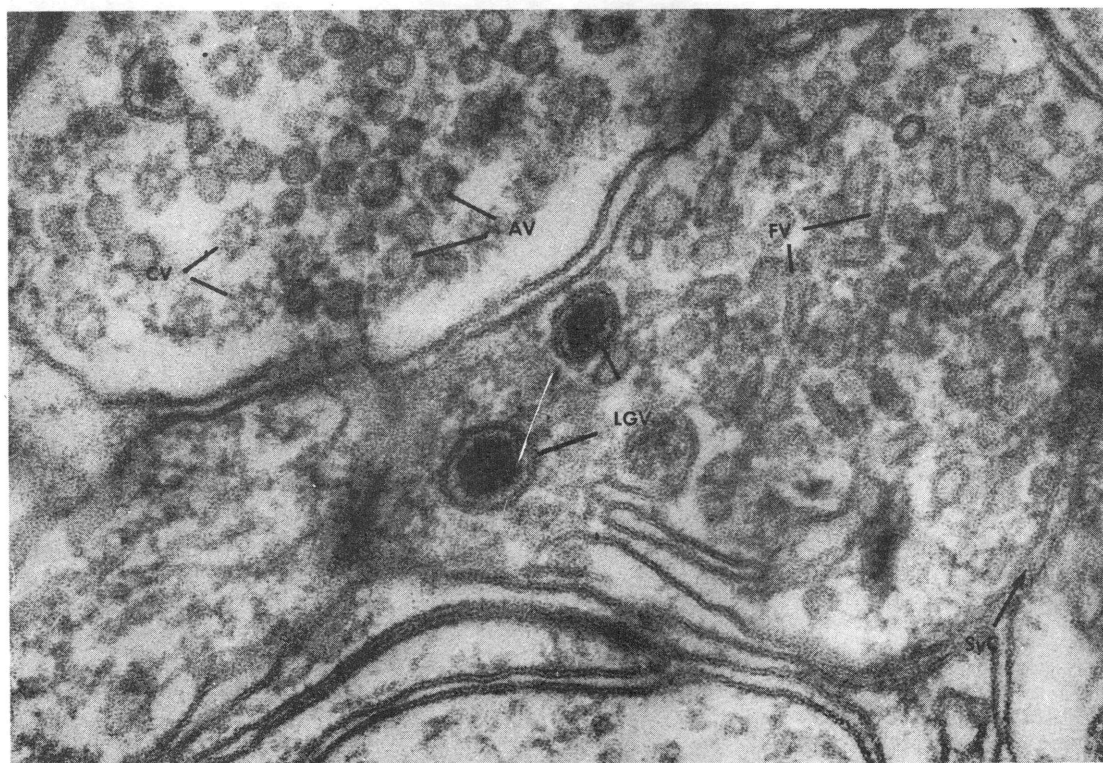


FIG. 7-19. En estos dos terminales nerviosos del hipotálamo de la rata se observan cuatro de los cinco tipos de vesículas sinápticas. AV, vesícula agranular; CV, vesícula con cubierta; FV, vesícula aplanada; LGV, vesícula granular grande. 135.000 $\times$. (De Robertis, no publicada.)

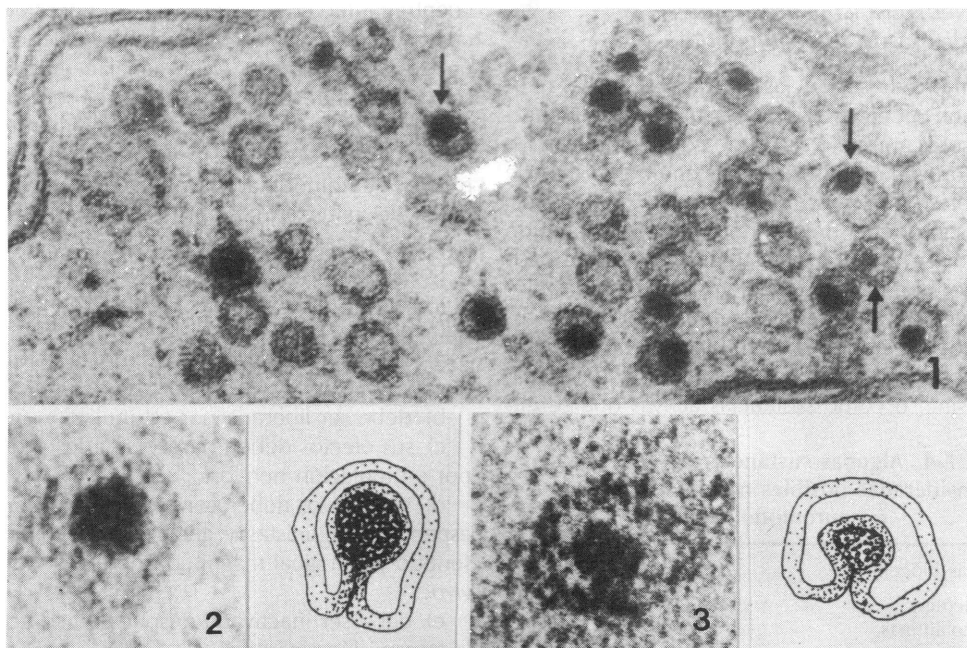


FIG. 7-20. Micrografía electrónica de nervios simpáticos en la glándula pineal de la rata. Los diagramas ilustran el modelo de dos compartimientos de las vesículas granulosas pequeñas. Se indican diferentes posibles estadios en el desarrollo del gránulo interno (en 1 con flechas y en 2 y 3). El modelo sugiere un compartimiento claro externo o matriz, y uno central dentro de la membrana invaginada. (Cortesía de A. Pellegrino de Iraldi.)

forman por un proceso de endocitosis y parecen estar relacionadas con el reciclaje de la membrana presináptica. La cubierta está constituida por la proteína *clatrina* (cap. 8-48).

7-16. Durante el desarrollo de la neurona el tipo de neurotransmisor y de vesícula sináptica puede ser determinado por el medio

El desarrollo de las conexiones sinápticas implica la síntesis de determinado neurotransmisor y de un tipo especial de vesícula donde dicha sustancia se acumula.

En el sistema autónomo se hallan dos neurotransmisores principales —acetilcolina y noradrenalina— contenidos respectivamente en vesículas claras y en vesículas granulosas pequeñas. Tanto las neuronas adrenérgicas como las colinérgicas derivan de regiones especiales de las crestas neurales. Los neuroblastos emigran desde allí hacia los sitios que ocuparán en el adulto, dejan de dividirse y se diferencian para producir un transmisor u otro.

Varios experimentos demuestran que esta diferenciación es influida por el medio que rodea a las neuronas. Así, si las regiones de las crestas neurales, que normalmente dan células adrenérgicas, se implantan en las zonas anteriores (rostrales) del embrión, expresan una función colinérgica y producen

vesículas claras. En cambio, si las células de la región rostral (normalmente colinérgicas) se implantan en la zona media del tronco, se convierten en neuronas adrenérgicas con terminales provistos de vesículas granulosas.

Un experimento más directo consistió en cultivar neuronas simpáticas del ratón recién nacido con un método que elimina todos los elementos no neuronales (células gliales). En este caso, las neuronas se vuelven adrenérgicas y producen noradrenalina. En cambio, si las mismas neuronas crecen en presencia de tejido cardíaco, la mayoría se vuelven colinérgicas. Este efecto también puede producirse agregando el líquido en el cual crecen las células del corazón al cultivo de células adrenérgicas puras. Ello sugiere la existencia de un factor de desarrollo colinérgico capaz de promover la diferenciación hacia la síntesis de acetilcolina.

Estos y otros experimentos han llevado a pensar que al comienzo las neuronas son todavía “plásticas”, es decir, que pueden cambiar el neurotransmisor y el tipo de vesícula por influencia del medio.

Se cree que la diferenciación química de una neurona es condicionada por las células vecinas, no neuronales, por intermedio de factores de desarrollo que ingresan por transporte retrógrado. Además debe considerarse la influencia de la actividad eléctrica de otras neuronas que puede modificar la respuesta a esos factores del desarrollo.

7-17. Neurotransmisores. Síntesis y metabolismo de la acetilcolina

El número de sustancias producidas por las neuronas que pueden considerarse posibles neurotransmisores aumentó de modo considerable en los últimos años. En la tabla 7-4 se enumeran más de 30 posibles neurotransmisores, pero el número real podría ser por lo menos de 50 y va en rápido aumento. La mayoría son sustancias de bajo peso molecular que pertenecen al grupo de aminas biógenas, aminoácidos, purinas y neuropéptidos. Algunos de los integrantes de este último grupo ya eran conocidos como hormonas (por ejemplo, oxitocina, vasopresina) o como sustancias activas que se en-

cuentran tanto en el sistema neuroendocrino difuso como en el encéfalo (por ejemplo, colecistoquina, sustancia P, etc.). Cabe señalar, empero, que sólo algunas de estas sustancias reúnen todos los criterios para ser identificadas totalmente como neurotransmisores. Otras se consideran, por el momento, neuromoduladoras, es decir, sustancias capaces de influir en la transmisión sináptica por diferentes mecanismos.

Los principales criterios que se utilizan para definir a una sustancia como neurotransmisor son los siguientes:

- a) debe encontrarse dentro de la terminación nerviosa;
- b) debe ser liberada por estimulación nerviosa;
- c) sus efectos deben parecerse a los producidos por estimulación nerviosa;
- d) sus efectos deben ser modificados por drogas específicas (agonistas y antagonistas) en el mismo sentido y con igual magnitud que en la situación *in vivo*;
- e) debe ser inactivada después de su acción en la transmisión sináptica.

Para dar un ejemplo consideremos el caso del sistema de la acetilcolina (ACh). El neurotransmisor ACh es sintetizado por combinación de la colina y la acetilcoenzima A, dirigida por la enzima colina acetiltransferasa (fig. 7-21). La enzima se produce en el cuerpo neuronal y es transportada hacia el terminal nervioso por el flujo axónico.

Acetilcolina. Se halla almacenada principalmente dentro de las vesículas sinápticas, aunque también puede estar disuelta en el citoplasma. Después de su liberación hacia la hendidura sináptica, la acetilcolina interactúa con el receptor ubicado en la membrana postsináptica y es degradada en colina y acetato por la acetilcolinesterasa, una enzima hidrolítica presente en las membranas de los terminales nerviosos. Según se advierte en la figura 7-21, la colina es luego reincorporada al terminal nervioso por medio de un mecanismo de transporte de alta afinidad. El fraccionamiento celular permite demostrar que los tres componentes principales del sistema colinérgico —colina acetiltransferasa, acetilcolina y acetilcolinesterasa— se encuentran en una fracción especial de las terminaciones nerviosas del cerebro.

Neuropéptidos. Uno de los adelantos importantes en el campo de los neurotransmisores fue el descubrimiento de numerosos péptidos en las neuronas, que pueden participar en la transmisión del impulso nervioso. Estos neuropéptidos comprenden moléculas que pueden contener desde 2 (por ejemplo, la carnosina) hasta 30 aminoácidos (tabla 7-4). Se originan en los ribosomas del pericarión como precursores más grandes, se acumulan en vesículas y son transportados hasta el terminal ner-

TABLA 7-4. Algunas sustancias que pueden ser consideradas posibles neurotransmisores o neuromoduladores

1. Aminas biógenas	
Acetilcolina	
Catecolaminas	
Dopamina	
Noradrenalina	
Adrenalina	
5-Hidroxitriptamina (serotonina)	
Otras aminas primarias	
Histamina	
Octopamina	
Feniletilamina	
Feniletanolamina	
Poliaminas	
Putrescina	
Espermina	
Espermidina	
2. Aminoácidos	
Acido glutámico	
Acido aspártico	
Glicina	
Acido γ-aminobutírico (GABA)	
Taurina	
Prolina	
3. Purinas	
Adenosina	
Adenosina trifosfato (ATP), etc.	
4. Neuropéptidos (número de aminoácidos)	
Sustancia P	(11)
Carnosina	(2)
Hormona liberadora de tirotropina (TRH)	(3)
Neurotensina	(13)
Somatostatina	(14)
β-Endorfina	(31)
Encefalina	(5)
Angiotensina I	(10)
Angiotensina II	(8)
Oxitocina	(9)
Vasopresina	(9)
Colecistoquina	(8)
Bradiquinina	(9)

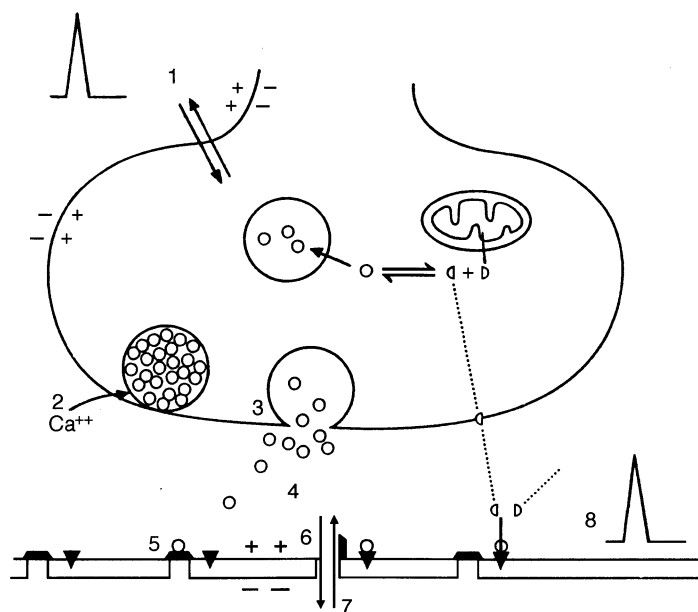


FIG. 7-21. Esquema de una sinapsis colinérgica, como la de la unión neuromuscular, que muestra los componentes del sistema de la acetilcolina y los pasos del mecanismo de neurotransmisión. 1, potencial de acción que llega a la terminación nerviosa; 2, entrada del Ca^{2+} a la terminación presináptica; 3, liberación de las moléculas de acetilcolina contenidas en la vesícula sináptica por fusión y apertura en la hendidura sináptica; 4, difusión del neurotransmisor dentro de la hendidura; 5, interacción con el receptor; 6, apertura del canal postsináptico; 7, corrientes de Na^+ y de K^+ a través del canal; 8, interacción de la acetilcolina con la acetilcolinesterasa e hidrólisis, con recaptación de la fracción colina; potencial de acción postsináptico. Se ilustra, dentro de la terminación nerviosa, la síntesis de acetilcolina por la colinaacetilasa. (Cortesía de O. Uchitel.)

vioso, donde finalmente son fraccionados como péptidos más pequeños y liberados. Como ocurre con las catecolaminas y la serotonina, los péptidos son captados nuevamente por la terminación nerviosa o inactivados por peptidasas.

Aun cuando algunos neuropéptidos, como la sustancia P, eran conocidos desde hace mucho tiempo, indudablemente el descubrimiento por Hughes de las encefalinas llevó al primer plano de la neurobiología el papel de los neuropéptidos.

En la actualidad se reconocen tres grupos principales de péptidos opioides:

a) El **sistema de la β -endorfina**, que se encuentra principalmente en el lóbulo anterior y la porción intermedia de la hipófisis, así como en un número limitado de neuronas del núcleo arciforme del hipotálamo. Estas neuronas poseen largos axones que se proyectan hacia las estructuras límbicas, el tálamo, el *locus coeruleus*, etc. Este sistema es limitado y en él la β -endorfina coexiste con la α -melanotropina (α -MSH) y la β -lipotropina (β -LPH).

b) El **sistema de la encefalina** tiene una distribución más amplia y difusa en el sistema nervioso central y en general se encuentra en neuronas con axones cortos.

c) El **sistema de la dinorfina** comprende varios neuropéptidos con cadenas de 8 a 32 aminoácidos.

La concentración de las dinorfinas en el encéfalo es mucho menor que la de las encefalinas; se localizan sobre todo en algunos núcleos basales.

7-18. Identificación citoquímica de sistemas neuronales. Coexistencia de neurotransmisores

El gran número de neuronas que se encuentran en el sistema nervioso central y periférico puede ser diferenciado no solo por su morfología y sus contactos sinápticos, sino por los neurotransmisores que pueden sintetizar, almacenar y liberar en las terminaciones nerviosas. En los últimos años se desarrollaron potentes métodos para identificar la naturaleza bioquímica de los neurotransmisores, lo cual permite efectuar un mapeo neuroquímico de neuronas sobre la base de los neurotransmisores que sintetizan, pero también de los receptores específicos que tienen en su membrana.

La identificación puede realizarse por fraccionamiento celular de diferentes regiones del encéfalo, que incluyen la separación de neuronas, sinaptosomas, vesículas sinápticas y membranas sinápticas. Se pueden identificar las neuronas que producen catecolaminas (noradrenalina, dopamina) o indolaminas (serotonina) mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas de fluorescencia o de pe-

roxidasa. La autorradiografía puede usarse para localizar neuronas y terminaciones nerviosas mediante la administración de neurotransmisores o precursores marcados. Por ejemplo, en la figura 7-22 se ilustra una sinapsis glomerular del cerebelo que fue sometida a la captación de serotonina radiactiva. En la actualidad la técnica más potente se basa en el uso de métodos inmunohistoquímicos para los neurotransmisores (en especial, neuropéptidos) o las enzimas específicas que intervienen en su metabolismo. El empleo de los métodos antedichos, en algunos casos, confirmó la llamada *regla de Dale*, que dice que cada neurona produce un único neurotransmisor, pero en los últimos años se observaron varias excepciones a esta regla y en la actualidad se acepta que pueden coexistir en el mismo terminal nervioso dos o más neurotransmisores. Uno de los primeros casos de coexistencia de neurotransmisores se observó en los nervios simpáticos de la glándula pineal, cuyas vesículas sinápticas contienen tanto noradrenalina como serotonina. Más frecuente es el caso en que una amina biógena, como dopamina o serotonina, coexiste con neuropéptidos. Por ejemplo, la serotonina y la sustancia P (tabla 7-4) pueden coexistir en el mismo terminal y aun en la misma vesícula sináptica del núcleo denso. Otros ejemplos están representados por la coexistencia del polipéptido intestinal

vasoactivo (VIP) con la acetilcolina en las neuronas colinérgicas; la presencia de neuropéptidos en las terminaciones nerviosas colinérgicas que inervan la médula suprarrenal y también en neuronas simpáticas y células cromafines.

La coexistencia de un neurotransmisor con el neuropéptido podría regular la respuesta de la célula efectora. Por ejemplo, el neuropéptido podría modificar (positiva o negativamente) la interacción del neurotransmisor con su receptor. En la terminación nerviosa es posible proponer la presencia de vesículas mixtas que contienen ambas sustancias, o de diferentes vesículas para el neurotransmisor y para el neuropéptido. En ciertos casos la liberación del neuropéptido o del neurotransmisor dependería de la intensidad del estímulo. En algunos sistemas periféricos se observó que el neurotransmisor provoca una rápida respuesta de corta duración, mientras que el neuropéptido produce un efecto más perdurable.

El hecho de que puedan coexistir varios neuropéptidos en la misma célula se explica por la existencia de un precursor común que se fragmenta en péptidos más pequeños. El sistema más conocido es el *sistema de la proopiomelanocortina*, que produce al mismo tiempo varios péptidos activos que actúan como hormonas o neurotransmisores. Como se ilustra en la figura 7-23, un solo péptido

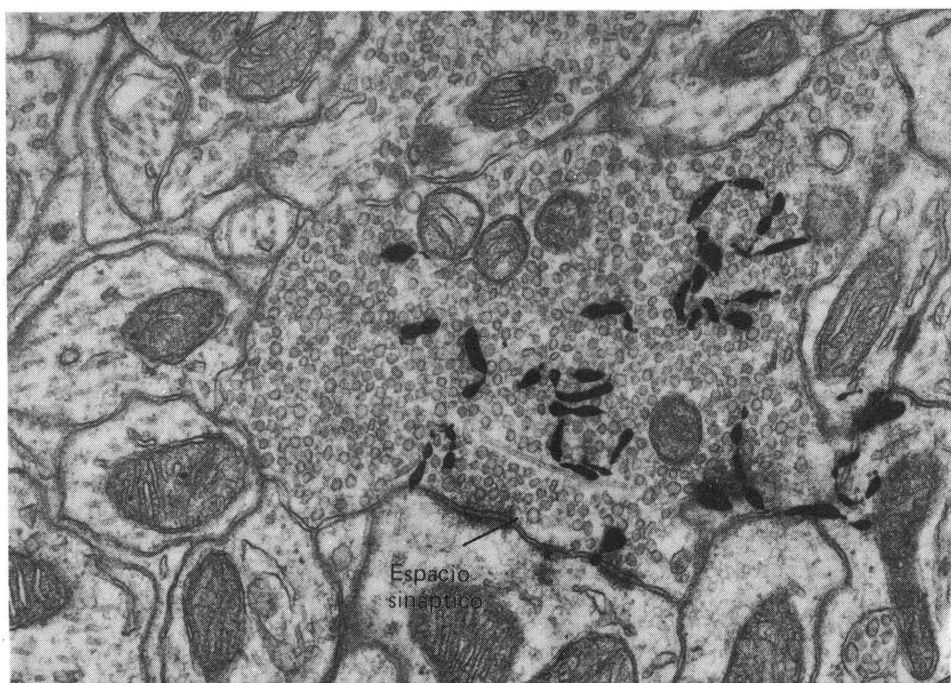


FIG. 7-22. Radioautografía con el microscopio electrónico de una sinapsis glomerular del cerebelo luego de la administración de 5-HT-³H. La captación de serotonina en el terminal se demuestra por la presencia de gránulos de plata. 41.000×. (Cortesía de C. Sotelo y A. Beaudet.)

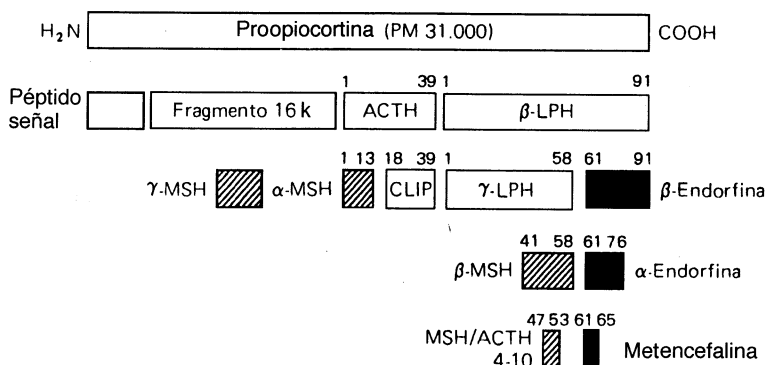


FIG. 7-23. Diagrama que representa al precursor del sistema proopiomelanocortina y los distintos péptidos que se producen por proteólisis sucesivas. El precursor origina cantidades equimolares de adrenocorticotropina (ACTH) y β-lipotropina (β-LPH) además del péptido señal y otro de 16 kDa. La ACTH se divide para generar hormona α-melanocitoestimulante (α-MSH) y un péptido de la porción intermedia (CLIP). La β-LPH da δ-LPH y β-endorfina. Esta última junto con la α-endorfina y la metencefalina son péptidos opioides (en negro). Con líneas diagonales se indican las secuencias recurrentes de MSH. (Cortesía de P. E. Cooper y J. B. Martin.)

de gran tamaño (134 aminoácidos) es el precursor común de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) y de la β-lipotropina (LPH). Además de ACTH, puede dar origen a α-melanotropina (MSH) y a un fragmento (CLIP) en la porción intermedia de la hipófisis. Por otro lado, la β-LPH puede dar lugar a γ-LPH, a α-MSH y a los neuropéptidos β-endorfina y metencefalina (tabla 7-4).

Además del sistema de la proopiomelanocortina, otros sistemas precursores como los de la proencefalina A y la proencefalina B pueden generar diferentes neuropéptidos.

7-19. El transporte del neurotransmisor involucra el de las vesículas sinápticas

Aunque la síntesis del neurotransmisor se produce en forma predominante en el terminal nervioso, también puede hacerse en el pericarion. Por lo tanto, es posible que parte del transmisor sea transportado a los sitios de liberación por las vesículas sinápticas. En la figura 7-24 se indica en forma esquemática el posible flujo de los diversos tipos de vesículas. Estas son transportadas por un flujo axoplasmático rápido, que puede comprender a los neurotúbulos, los cuales, en ciertas condiciones, aparecen asociados a las vesículas, aun dentro del terminal nervioso. Las drogas que como la colchicina y la vinblastina despolimerizan a los neurotúbulos producen reducción y hasta bloqueo del transporte de vesículas. En la figura 7-24 se observa que la mayoría de las vesículas son transportadas en sentido centrífugo; solo las vesículas con cubierta, que se originan por endocitosis, pueden desplazarse por transporte retrógrado hacia el pericarion (para la descripción del transporte microtubular véase cap. 5-14).

7-20. La liberación del transmisor está relacionada con el papel de las vesículas sinápticas en la transmisión nerviosa

La llamada *hipótesis vesicular* de la transmisión sináptica sostiene que con la llegada del impulso nervioso al terminal se produce la liberación simultánea de gran número de cuantos (es decir, unidades multimoleculares o paquetes) del neurotransmisor a partir de las vesículas sinápticas. Por ejemplo, el potencial postsináptico de la placa mio-neural podría originarse por la liberación sincrónica de 100 cuantos de acetilcolina, que representan alrededor de 2×10^6 moléculas.

Empero, en una sinapsis en reposo la liberación espontánea puede producirse aproximadamente cada segundo y esto desarrolla los llamados *potenciales miniatura de la placa* (mepp), cada uno de los cuales se atribuye a la liberación de un cuanto.

El número de mepp aumenta cuando el terminal nervioso es despolarizado parcialmente o cuando asciende la concentración de K⁺ en el medio.

Los cálculos sobre el contenido de acetilcolina por vesícula sugieren que debe de estar muy concentrada. La solución intravesicular de acetilcolina es probablemente isoosmótica con el plasma (0,4-0,5 M). Se estima que en una vesícula hay de 12.000 a 21.000 moléculas de acetilcolina. Es posible que el ATP y ciertos componentes intravesiculares favorezcan la concentración de la acetilcolina dentro de la vesícula.

Desde los primeros tiempos, después del descubrimiento de las vesículas sinápticas, se trató de demostrar su posible papel en la transmisión. El corte del axón produce la degeneración del terminal con la rápida lisis de las vesículas. Estas alteraciones coinciden con el momento en el cual se

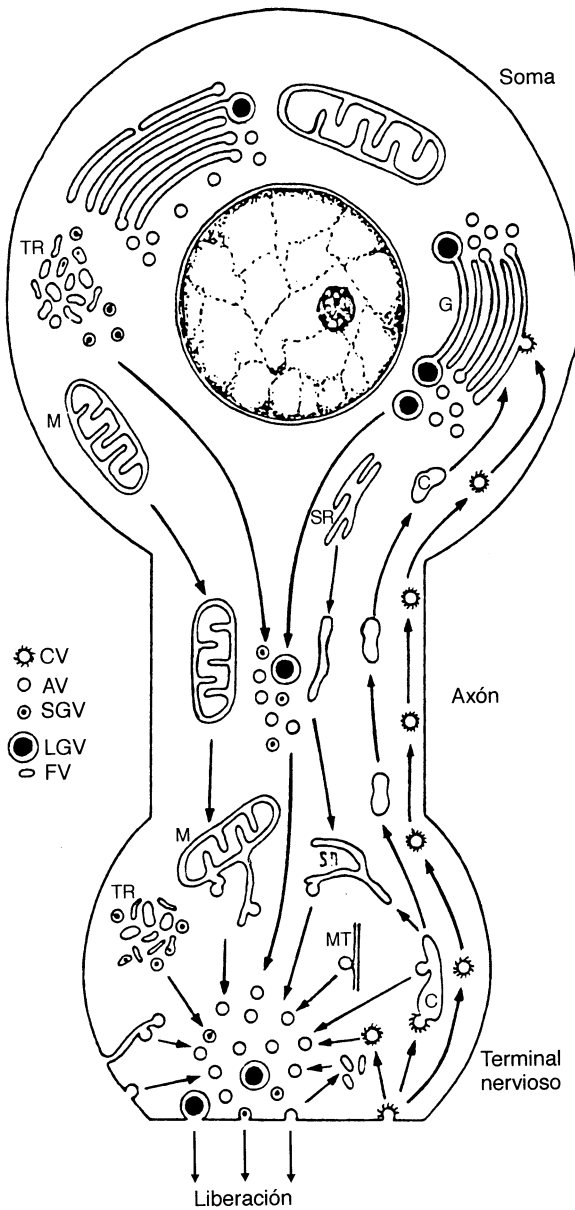


FIG. 7-24. Posibles sitios de origen, transporte y liberación de los distintos tipos de vesículas sinápticas. AV, vesícula clara sin gránulo; CV, vesícula con cubierta; SGV, vesícula granulada pequeña. Las SGV se representan originándose en un retículo tubular (TR). M, mitocondria; MT, microtúbulo; G, Golgi. Véase que algunas CV son transportadas por flujo axónico retrógrado. (De M. P. Osborne [1977].)

interrompe la transmisión nerviosa. La estimulación eléctrica de alta frecuencia produce una reducción del número de vesículas. Estos hallazgos fueron confirmados por diversos investigadores en la unión mioneural y en el tejido eléctrico.

En la electroplaca de *Torpedo* estimulada hasta alcanzar la fatiga se produce la pérdida del 50% de las vesículas. Al mismo tiempo se observa que la

membrana presináptica aumenta su superficie y muestra expansiones digitiformes, que probablemente son el resultado de la integración de las membranas vesiculares.

Para mostrar los fenómenos morfológicos que aparecen en lapsos de milisegundos durante la transmisión de un solo impulso nervioso se necesita un procedimiento mediante el cual pueda efectuarse en dicho período la fijación instantánea: el congelamiento rápido. Con esta técnica se observó que el número de fositas correspondientes a la apertura de las vesículas a ambos lados de la zona activa de la unión neuromuscular aumentaba con el estímulo. Además, si se incrementaba la liberación del transmisor con el uso de 4-aminopiridina, el congelamiento rápido revelaba vesículas sinápticas en proceso de abrirse en la hendidura sináptica. Estos hallazgos implican que la hipótesis vesicular es esencialmente correcta.

Un hecho interesante es que si se fija la sinapsis en presencia de Ca^{2+} , cierto número de vesículas muestra en su interior un pequeño gránulo de Ca^{2+} adherido a la membrana. Cuando la sinapsis es estimulada, las vesículas que llevan este gránulo son las que preferentemente se liberan. Estos hallazgos probablemente se relacionen con el papel del Ca^{2+} en la liberación del transmisor.

Con el siguiente experimento se demuestra otro papel del calcio. Si se aplica veneno de la araña *Latrodectus* ("viuda negra") a la unión neuromuscular, se produce una intensa liberación de acetilcolina y depleción de las vesículas sinápticas. Mediante congelación-fractura se observan las fositas de la membrana presináptica, que corresponden al sitio de apertura de las vesículas. En presencia de Ca^{2+} el veneno provoca la liberación de acetilcolina, pero no la depleción de las vesículas sinápticas. Si se coloca peroxidasa en el medio extracelular, ésta es captada por las vesículas. Este hallazgo implica que las vesículas son recicladas y usadas de nuevo. La presencia de Ca^{2+} es por eso importante para la recuperación de las vesículas sinápticas.

Otros experimentos demostraron que la falta de calcio origina la interrupción de la distribución ordenada de partículas presinápticas intramembranas que se encuentran en los sitios de la unión neuromuscular (fig. 7-14).

7-21. El mecanismo de liberación probablemente implique el uso repetido, la exocitosis y el reciclaje de las vesículas sinápticas

Uno de los problemas más discutidos respecto de la liberación del transmisor es si ésta implica exclusivamente un mecanismo de exocitosis común (cap. 8-29) o si las vesículas sinápticas son usadas repetidas veces antes de la exocitosis final.

Si esto último fuese cierto, la unión de las vesículas a los sitios de liberación sería temporaria y en cada oportunidad la vesícula sería recargada con transmisor. Hay argumentos que favorecen ambos puntos de vista y es probable que los dos mecanismos intervengan.

Los estudios cuantitativos en motoneuronas de crustáceos han llevado a proponer que las vesículas son reutilizadas, o bien que existe un mecanismo por el cual la incorporación de las vesículas a la membrana se equilibra con la formación de nuevas vesículas a partir de ella. En relación con esto está la observación de que, como sucede en las sinapsis adrenérgicas, el transmisor recientemente sintetizado (o recapturado desde la hendidura sináptica) es el primero que se libera.

En las sinapsis de *Torpedo* existen aparentemente dos poblaciones de vesículas colinérgicas, una con una relación ACh/ATP más alta (las llamadas vesículas supercargadas) y otra con una relación menor. Se piensa que las vesículas supercargadas están asociadas con la membrana presináptica y que por estimulación se liberan primero.

Se ha sostenido que las vesículas formadas recientemente pueden tener varios ciclos de secreción y acumulación antes de que sufran la exocitosis y se incorporen a la membrana. No obstante, en la actualidad se acepta, en general, la existencia de un mecanismo de reciclaje de las vesículas.

Es posible que luego de varios ciclos las membranas vesiculares se incorporen a la membrana presináptica y sean posteriormente recapturadas. Esto podría hacerse por endocitosis directa, con formación de vesículas, o por intermedio de estructuras membranosas como el retículo endoplasmático liso. En este proceso se forman frecuentemente vesículas con cubierta (fig. 7-24). El reciclaje de la membrana de la vesícula es un mecanismo de ahorro de energía que evita su síntesis constante por parte de la neurona.

7-22. El acoplamiento entre la despolarización y la secreción del transmisor es mediado por iones calcio

El acoplamiento entre la despolarización, producida por la llegada del impulso nervioso, y la secreción de acetilcolina es mediado por el influjo de iones calcio. El Ca^{2+} extracelular constituye un requisito imprescindible para la liberación de acetilcolina por el terminal nervioso, ya que cuando el impulso nervioso llega al terminal, la despolarización origina una entrada de calcio por aumento de la permeabilidad a éste en la membrana presináptica (fig. 7-21), que supuestamente tiene lugar por canales que dependen del voltaje. En la figura 7-25 se muestra un esquema tentativo de este hipotético

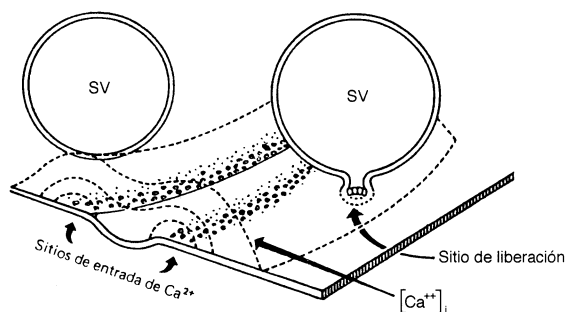


FIG. 7-25. Diagrama de la zona activa de la unión mioneural (fig. 7-14) donde se representan las partículas intramembranosas que son los posibles canales de Ca^{2+} . La apertura de estos canales por acción del voltaje produce la entrada de Ca^{2+} y esto induce la liberación del transmisor a partir de la vesícula sináptica (SV). Las líneas quebradas indican los cambios de concentración de Ca^{2+} en la vecindad de la vesícula. (Cortesía de R. Llinás.)

mecanismo en la unión neuromuscular. La entrada de Ca^{2+} por los canales genera un aumento local de la concentración de Ca^{2+} que desencadena la apertura de la vesícula.

Nuestra descripción del posible papel de las vesículas sinápticas en la transmisión nerviosa está en gran medida de acuerdo con la hipótesis vesicular (fig. 7-21), pero cabe mencionar que se han formulado otras hipótesis no vesiculares para la liberación del neurotransmisor.

Papel de la calmodulina. En el curso de este capítulo mencionamos el papel del Ca^{2+} en muchas actividades de la sinapsis. En varios casos el efecto del Ca^{2+} parece estar mediado por la proteína fijadora del calcio calmodulina. Por ejemplo, la calmodulina que se encuentra en la terminación nerviosa puede mediar: a) el efecto del Ca^{2+} en la liberación del neurotransmisor; b) la interacción de la vesícula sináptica con la membrana presináptica; c) la fosforilación de las proteínas sinápticas y de la tubulina (véase más adelante). Todas estas funciones son inhibidas por inhibidores de la calmodulina, como por ejemplo la trifluoperazina.

La calmodulina está concentrada en la densidad postsináptica (fig. 7-11), donde se halla unida a una proteína mayoritaria de 51 kDa. Además activa la fosforilación de esta última por una proteína quinasas.

RECEPTORES SINAPTICOS Y RESPUESTA FISIOLÓGICA

Desde el comienzo de este siglo, y a consecuencia de los trabajos de Langley, Ehrlich y otros, se sostuvo que el transmisor interactúa con un receptor específico localizado en la membrana celular. Sin embargo, durante muchos años solo se tuvo un conocimiento indirecto de estos receptores sinápticos.

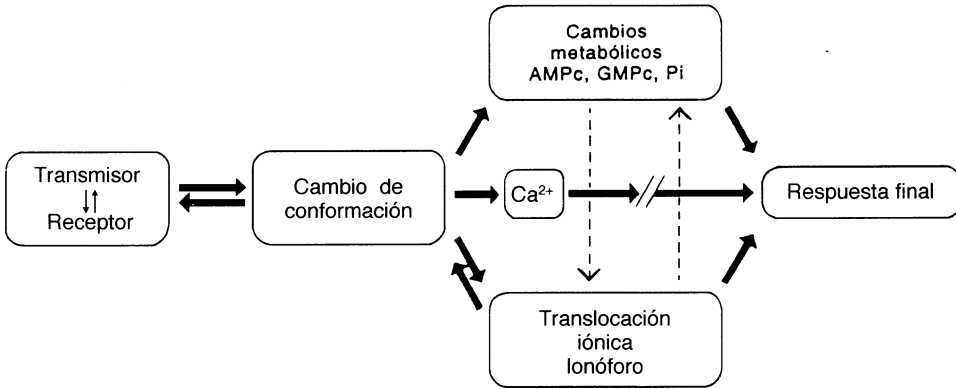


FIG. 7-26. Esquema que muestra la interacción primaria entre el transmisor y el receptor y su consecuencia. (Véase la descripción en el texto.)

cos, basado en la respuesta final obtenida de esa interacción. Por ejemplo, se sabía que la acetilcolina produce la contracción del músculo esquelético o la secreción de una glándula, y que estos dos efectos pueden ser bloqueados por el curare y la atropina, respectivamente.

Ya en 1955, Nachmanson sostuvo que el “receptor colinérgico es una proteína que, al unirse a la acetilcolina, sufre una transición conformacional que da como resultado un cambio de permeabilidad”. En la figura 7-26 se indica que la interacción primaria entre el transmisor y el receptor está acoplada a la translocación de iones a través de la membrana celular —es decir, el canal o ionóforo— y que, por medio de varios mecanismos interpuestos, puede producir una respuesta final. Esta figura demuestra asimismo la posible relación de la interacción primaria con ciertos procesos metabólicos que involucran al AMP cíclico y a otros mecanismos.

La interacción primaria entre el neurotransmisor y el receptor puede estudiarse directamente, en membranas sinápticas aisladas, mediante el uso de ligandos marcados. Estos pueden ser el neurotransmisor correspondiente o drogas que actúan como agonistas —es decir, de manera similar al neurotransmisor— o antagonistas —que bloquean la acción de los agonistas—.

La interacción ligando-receptor muestra las siguientes características:

a) *Saturabilidad*. Dado que existe un número definido de sitios receptores en la membrana, si aumenta la concentración del ligando se alcanza un nivel de saturación de la unión; esto se expresa como unión máxima o $B_{m\acute{a}x}$.

b) *Alta afinidad*. La afinidad —es decir, el grado de intensidad de la unión— depende de la constante de disociación determinada cinéticamente o en equilibrio (K_D). La afinidad está en relación inversa con K_D . (En general, los agonistas tienen una

K_D dentro de límites micromolares y los antagonistas dentro de límites nanomolares o picomolares.)

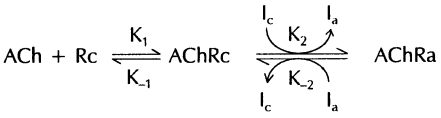
c) *Reversibilidad*. La interacción ligando-receptor comúnmente no comprende una unión covalente y puede ser disociada, sea diluyendo el ligando o por acción de otras drogas.

d) *Especificidad*. La interacción debe ser específica para el ligando y puede ser desplazada por los correspondientes agonistas y antagonistas.

En una segunda etapa (fig. 7-26), los neurotransmisores alteran la excitabilidad de la membrana postsináptica, al cambiar el potencial de membrana y/o la resistencia de ésta. Este último efecto implica un cambio en la permeabilidad de la membrana a uno o más iones. Por otra parte, el efecto sobre el potencial depende de cuál es la permeabilidad iónica que se ha modificado (véase más adelante).

7-23. El receptor de la acetilcolina está acoplado a la translocación de iones Na^+ y K^+

Tomando como ejemplo la interacción de la acetilcolina en la unión neuromuscular (o la electroplaca), el efecto sobre la translocación iónica puede expresarse mediante el siguiente esquema:



en el cual la ACh que interactúa con el receptor (Rc) forma primero un complejo, que se encuentra en estado cerrado y luego, en un segundo paso, pasa al estado abierto AChRa (I_c e I_a corresponden a los ionóforos cerrados y abiertos, respectivamente).

Aquí debemos señalar la diferencia entre los canales axónicos que analizaremos más abajo y los relacionados con este receptor de acetilcolina. Mientras que en el axón hay canales de Na^+ y de K^+ separados y regulados por el potencial de mem-

brana, en la membrana postsináptica ambos iones usan el mismo canal y la compuerta está impulsada por la interacción entre el neurotransmisor y la proteína receptora (fig. 7-21).

En particular, el empleo de delicados microelectrodos insertados en la unión neuromuscular proporcionó una de las mejores evidencias del funcionamiento de los receptores a nivel molecular. Ya se ha comentado que en esta preparación pueden recombinarse los denominados potenciales de placa en miniatura (mepp), espontáneos, que poseen

una amplitud aproximada de 0,1 mV y que representan la descarga de cuantos multimoleculares y aislados de acetilcolina. Katz y Miledi observaron que cuando se aplica una dosis mínima pero continua de acetilcolina sobre la unión neuromuscular, se producen fluctuaciones pequeñísimas del potencial de membrana que se superponen sobre una pequeña despolarización. La amplitud de estas fluctuaciones es varios cientos de veces menor que el mepp, es decir, del orden de 0,3 μ V, y constituye el llamado ruido de la membrana (fig. 7-27).

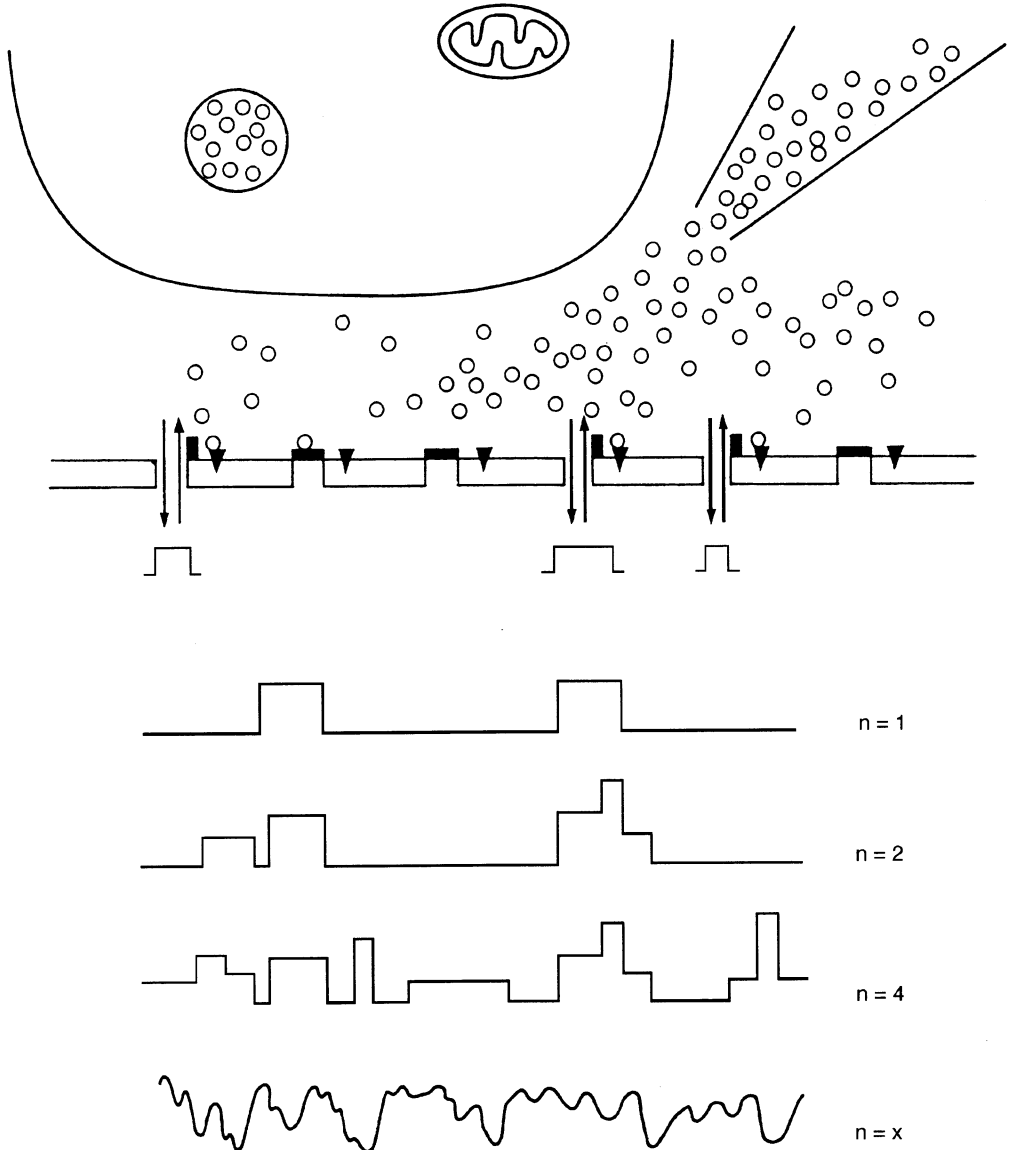


FIG. 7-27. Diagrama del experimento de Katz y Miledi para demostrar el ruido de la membrana. Se aplica con una micropipeta una dosis continua de acetilcolina. Esta difunde e interactúa con el receptor, abre los canales e interactúa con la acetilcolinesterasa. La apertura de los canales produce corrientes de duración variable según la cinética de apertura y cierre. $n = 1$, registro de un canal; $n = 2$, ídem de dos canales; $n = 4$, de cuatro canales; $n = x$, con el aumento de canales se produce el ruido de la membrana. (Cortesía de O. Uchitel.)

En el músculo desnervado de rana, en el que los receptores aparecen más allá de la unión mio-neural, es posible registrar la apertura y el cierre de los canales individuales. La corriente producida es equivalente a la translocación de 5×10^4 iones univalentes. La enorme amplitud que se produce en una sinapsis química se comprende fácilmente, ya que una o dos moléculas de acetilcolina, al interactuar con el receptor, pueden translocar más de 10.000 iones.

7-24. El cambio en el potencial de membrana depende de los iones translocados

El potencial de membrana en reposo o equilibrio (PMR) está determinado por el gradiente de concentración de las diferentes especies iónicas. En una neurona el PMR varía entre -50 y -100 mV y depende de la distribución de Na^+ , K^+ y Cl^- a través de la membrana. Cada uno de estos iones tiene su propio potencial de equilibrio (E), el potencial de Nernst (tabla 7-5).

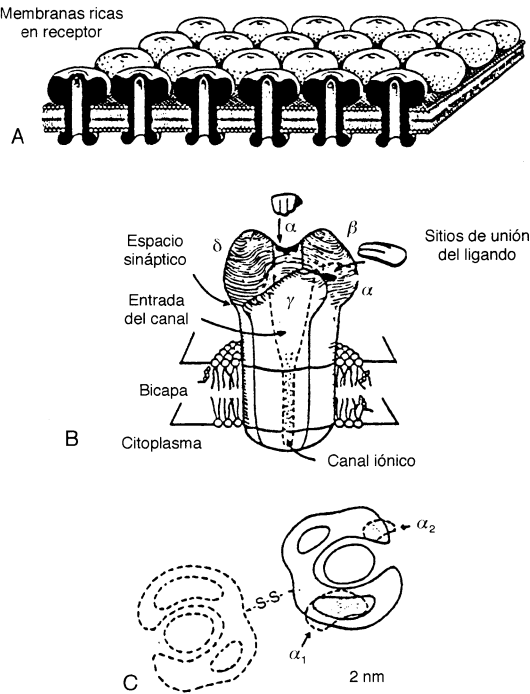


FIG. 7-28. A. Diagrama de la membrana postsináptica de *Torpedo* que muestra los receptores de acetilcolina muy apretados en la bicapa. (De R. Anholt, J. Lindstrom y M. Montal [1981].) B. Estructura tridimensional del receptor dentro de la bicapa, que muestra los sitios de fijación de α -bungarotoxina. La posición de las subunidades es tentativa. (De Kistler et al. [1982].) C. Topografía del receptor visto en proyección axial y perpendicular a la membrana. Se ven dos monómeros unidos por un puente S-S entre las subunidades δ . La posición de α_1 y α_2 se determinó por microscopía electrónica y por la fijación de α -bungarotoxina. (Cortesía de F. J. Barrantes.)

TABLA 7-5. Concentración de iones y potencial de Nernst

Ion	Concentración extracelular (mM)	Concentración intracelular (mM)	Potencial de Nernst (mV)
Na^+	145	12	E_{Na^+} +66
K^+	4	155	E_{K^+} -97
Ca^{2+}	1,5	$< 10^{-3}$	$E_{\text{Ca}^{2+}}$ > +97
Cl^-	120	4	E_{Cl^-} -90

En condiciones de reposo predomina la permeabilidad al K^+ —cuya concentración es alta en el interior de la célula— y el PMR está más próximo al E_{K^+} . En el caso de la unión neuromuscular o la electroplaca, cuando se abre el canal de la ACh, tanto el Na^+ como el K^+ se mueven en direcciones opuestas. El nuevo equilibrio alcanzado es intermedio entre $E_{\text{Na}^+} + E_{\text{K}^+}$ (por lo general) -15 mV, y la membrana se despolariza. En este caso el potencial sináptico es excitatorio (fig. 7-16).

En otras circunstancias, cuando hay aumento de la permeabilidad a un solo ion, el PMR estará algo más próximo al potencial de Nernst del ion correspondiente. Por ejemplo, cuando el canal transloca selectivamente el Cl^- se produce una hiperpolarización ($E_{\text{Cl}^-} = -90$ mV). Esto es lo que ocurre con el receptor del GABA que da lugar a un efecto inhibitorio.

En neuronas de moluscos (fig. 7-16) se han observado permeabilidades selectivas al Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} . Además, la permeabilidad puede ser aumentada o disminuida, lo que permite numerosas combinaciones.

7-25. Los receptores sinápticos son proteínas hidrofóbicas que están incluidas en el armazón lipídico de la membrana

En los últimos años fue posible separar las proteínas receptoras como entidades químicas y analizar en forma más directa su interacción con el transmisor. Su aislamiento es difícil porque se trata de proteínas intrínsecas, que requieren tratamientos drásticos para separarlas del esqueleto lipoproteico de la membrana.

Las proteínas receptoras son muy hidrofóbicas y están estrechamente relacionadas con los lípidos de la membrana. Para su aislamiento se emplean dos procedimientos: la extracción con solventes orgánicos y la acción de detergentes fuertes. Se han aislado proteínas receptoras colinérgicas a partir de las electroplacas de *Torpedo* y de *Electrophorus*, tejidos que poseen una de las inervaciones colinérgicas más ricas, pero también se han obtenido a

partir del músculo esquelético, el músculo liso y el cerebro. Del cerebro, la cápsula esplénica y el corazón se extrajeron proteínas receptoras adrenérgicas. También se aislaron proteínas receptoras para los aminoácidos glutamato y γ -aminobutirato a partir de los músculos de crustáceos que, como se sabe, tienen una doble innervación: excitadora (por medio del glutamato) e inhibidora (por el γ -aminobutirato). De membranas sinápticas de la corteza cerebral se separaron proteínas hidrofóbicas que se unen con L-glutamato, L-aspartato y γ -aminobutirato (De Robertis, 1975).

El empleo de microscopia electrónica de alto poder de resolución, de inmunoelectromicroscopia y de difracción de rayos X y de neutrones proporcionó una visión tridimensional del receptor de acetilcolina (AChR) en la membrana postsináptica. Los complejos AChR están densamente dispuestos en la bicapa lipídica (aproximadamente $10^4/\mu\text{m}^2$) y cada uno de ellos tiene un diámetro de 8,5 nm (fig. 7-28, A). El complejo tiene una altura total de 11 nm y sobresale ligeramente del lado citoplasmático. Como se muestra en la figura 7-28, B, la extensión por encima de la bicapa se localiza en el lado intersináptico de la membrana y tiene forma de embudo, con una depresión central. Existen dos sitios de unión de la α -bungarotoxina que se encuentran en esta extensión, pero no en la depresión central. Cuando se observan en disposición planar, gran parte de los complejos están dispuestos en dímeros a causa del puente S-S que une las subunidades α de cada complejo (fig. 7-28, C). Actualmente se dispone de alguna información acerca de la posición de las subunidades, y en general se cree que delimitan un canal iónico central de 0,7 nm aproximadamente.

7-26. Algunas funciones sinápticas de larga duración implican el uso de un segundo mensajero

La descripción de la interacción neurotransmisor-receptor ha hecho referencia a la translocación directa de iones. En el caso del receptor colinérgico nicotínico de la unión mioneural éste es un fenómeno muy rápido, que se produce en el término de uno o de pocos milisegundos. Sin embargo, en otros casos, como se indica en la figura 7-26, la interacción puede ocasionar además cambios metabólicos en la neurona que implican un efecto fisiológico de más larga duración.

Anteriormente en este capítulo se explicó la acción de señales moleculares que involucran receptores específicos y la enzima adenilato ciclasa. Como se mostró en la figura 7-8, el receptor está acoplado, por medio de la proteína G, con la adenilato ciclasa dentro de la membrana. Cuando el

ligando interactúa con el receptor, la enzima se activa y produce AMP cíclico (AMPC) a partir de ATP. Dicho nucleótido es considerado un segundo mensajero capaz de traducir mensajes extracelulares en una respuesta intracelular.

La primera indicación de que la adenilato ciclasa podía estar involucrada en la función sináptica fue dada por De Robertis, Sutherland y colaboradores con la demostración de que esta enzima se concentraba en los sinaptosomas aislados y esencialmente en la membrana del sinaptosoma. Se observó que la actividad de la enzima aumentaba después del choque osmótico, lo cual era un indicio de que los grupos activos de la enzima se orientaban hacia el interior del sinaptosoma.

En el sinaptosoma también hay fosfodiesterasa cíclica, que degrada al AMPC inactivo.

En la actualidad se considera que varias de las interacciones neurotransmisor-receptor que generan potenciales postsinápticos lentos —de 100 a 500 mseg— involucran un mensajero secundario con producción de AMPC.

Se ha encontrado en el cerebro otro mensajero, el GMP cíclico, que es producido por la guanilato ciclasa. En contraste con la adenilato ciclasa, esta enzima es principalmente soluble en el citosol.

Los niveles de AMPC y GMPc no solo dependen de la activación de las enzimas de síntesis, sino también de la fosfodiesterasa, que aparentemente es común a ambos nucleótidos. Si esta enzima es inhibida por las metilxantinas (como la cafeína) y otras drogas, los niveles de esos nucleótidos cíclicos aumentan. Tanto la fosfodiesterasa como la adenilato ciclasa son también reguladas por el Ca^{2+} (por ejemplo, la calmodulina).

La relación entre el AMPC y la función sináptica pudo establecerse más firmemente cuando se observó que la aplicación iontoforética de noradrenalina o de AMPC sobre las células de Purkinje del cerebelo reduce la frecuencia de disparo de estas neuronas. Además se demostró que la aplicación de noradrenalina aumenta el nivel de AMPC dentro de estas células.

Como se demuestra en la figura 7-29, varios neurotransmisores y otros agentes reguladores, como las hormonas y la prostaglandina E_1 , al actuar sobre receptores específicos, pueden activar el sistema del adenilato o del guanilato que produce el aumento del segundo mensajero correspondiente.

7-27. Un tercer paso de la regulación neuronal. Fosforilación de proteínas y sinapsina I

La figura 7-29 muestra también que los iones Ca^{2+} pueden actuar como segundo mensajero cuando son desplazados por la despolarización causada

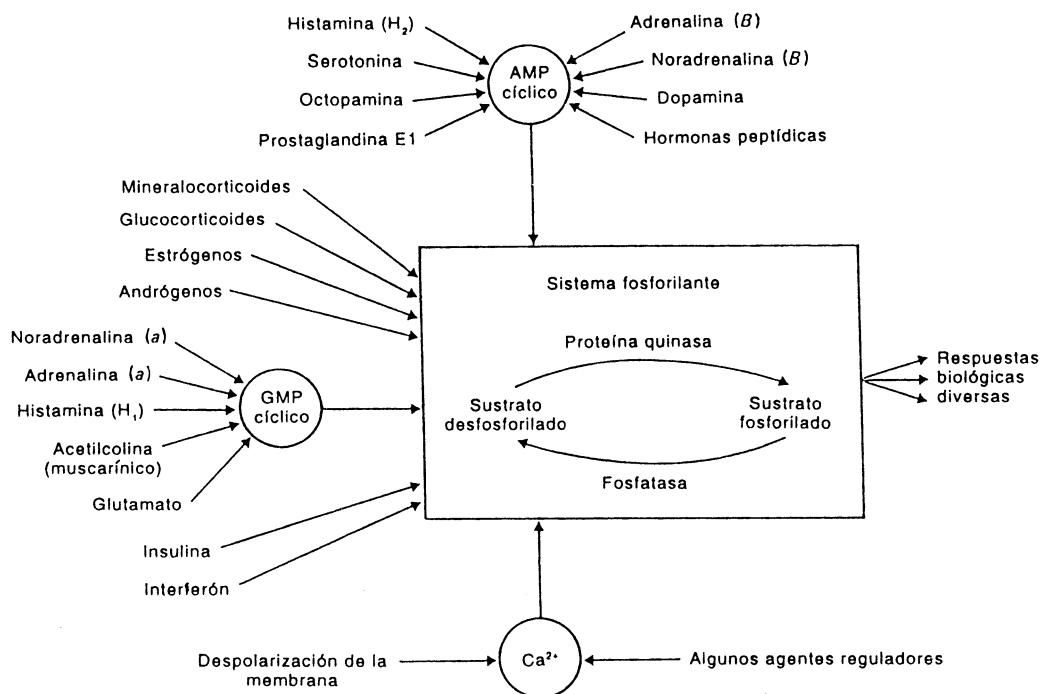


FIG. 7-29. Acción de diferentes neurotransmisores y de otros agentes reguladores sobre receptores específicos, que son capaces de activar la adenilato ciclasa o la guanilato ciclasa para producir AMP cíclico y GMP cíclico, respectivamente. Estos segundos mensajeros, y también el Ca^{2+} , pueden actuar sobre el sistema fosforilante y producir diversas respuestas fisiológicas. (Cortesía de P. Greengard.)

por el impulso nervioso. Todos estos mensajeros (es decir, AMPc, GMPc y Ca^{2+}) pueden actuar por medio de quinasas de proteínas, que fosforilan ciertos sustratos. Como se ve en la figura, el sistema de fosforilación proteica comprende asimismo fosfoproteína fosfatasas que pueden invertir la reacción.

El sistema completo para la fosforilación-desfosforilación se encuentra dentro del sinaptosoma, y se han purificado y clasificado las diversas quinasas. En el caso de la quinasa dependiente del AMP cíclico, se cree que el AMPc se une a la subunidad inhibitoria de dicha enzima y hace que se disocie de la subunidad catalítica. De esta manera la enzima activada puede transferir fácilmente grupos fosfato del ATP al sustrato proteico endógeno.

Utilizando un antisuero contra la proteína quinasa dependiente del GMP cíclico se halló que esta enzima está muy concentrada en el cerebelo y, sobre todo, en las células de Purkinje, cuyas dendritas, pericarión (con excepción del núcleo) y axón aparecen coloreados por la reacción inmunohistoquímica.

De las diversas proteínas que son fosforiladas hay una que es más notable por su elevada concentración y su localización única en los terminales axónicos. Es la llamada *sinapsina I*. Esta proteína es un doblete de dos subunidades, sinapsina IA y IB, que tienen respectivamente 86 y 80 kDa y se encuen-

tran en proporción 1:2 molar. Otras características son las propiedades básicas y la forma alargada de estas dos subunidades. La sinapsina I es el sustrato más sobresaliente no solo para las proteína quinasas dependientes del AMP cíclico, sino también para las quinasas dependientes del Ca^{2+} -calmodulina del cerebro.

Son muy interesantes los estudios sobre la localización de la sinapsina I, que sugieren que podría tener una función importante en las sinapsis. Se encuentra en la mayoría de las sinapsis, si no en todas, incluidas las periféricas (como la unión neuromuscular). Dentro del terminal nervioso la sinapsina I está asociada a vesículas sinápticas.

Esta proteína es del tipo periférico, está unida a la vesícula por uniones electrovalentes y puede ser extraída con soluciones de gran fuerza iónica. Es interesante señalar que la vesícula sináptica contiene también una proteína quinasa dependiente del Ca^{2+} que fosforila a la sinapsina I. En estado fosforilado la sinapsina I tiende a disociarse de la vesícula y al parecer es posible que este proceso esté sujeto a regulación fisiológica.

Mediante el uso de anticuerpos acoplados a la ferritina se demostró claramente con el microscopio electrónico la localización de la sinapsina dentro de la terminación nerviosa y alrededor de las vesículas sinápticas (fig. 7-30).

Si bien no se ha aclarado aún el papel exacto de la sinapsina I en la función sináptica, varios hechos sugieren que podría ejercer una importante función en la transmisión del impulso nervioso. Algunos de ellos son: 1) la localización específica en todas las sinapsis; 2) el hecho de que es fosforilada tanto por una proteína quinasa dependiente del AMP cíclico

como por otra dependiente del calcio, y 3) que el estado de fosforilación es alterado muy rápidamente (en cuestión de segundos) por la despolarización y por la interacción del receptor con neurotransmisores específicos. Es posible que la sinapsina I, localizada en la periferia de la vesícula sináptica, pueda interactuar con componentes extravesiculares,

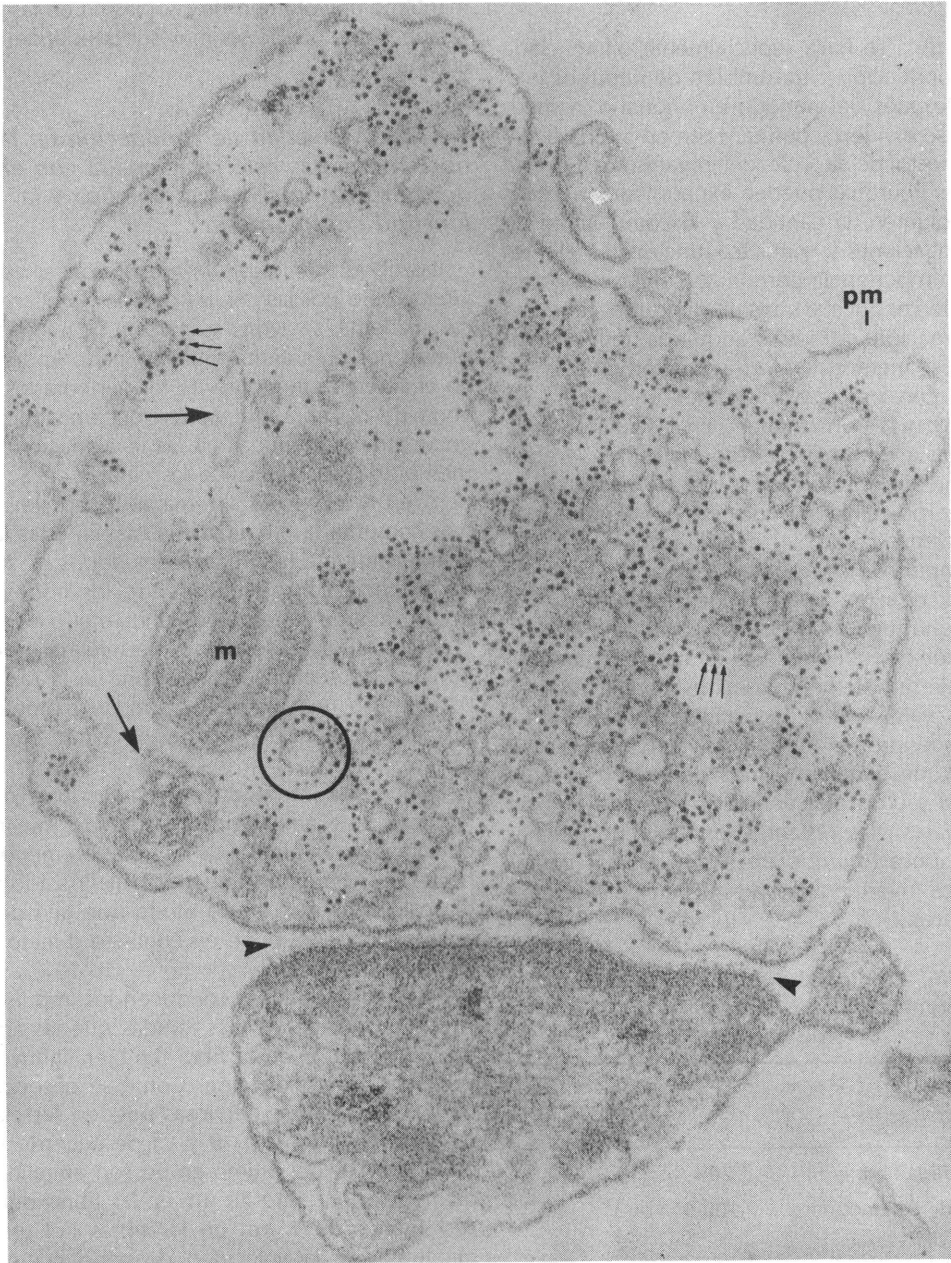


FIG. 7-30. Localización inmunocitoquímica de la sinapsina I en un sinaptosoma aislado. Los anticuerpos antisinapsina de conejo se han marcado con un anticuerpo de cabra conjugado con ferritina, dirigido contra la IgG de conejo. En el terminal las partículas de ferritina se encuentran alrededor de las vesículas sinápticas. En cambio, no hay partículas de ferritina en relación con la membrana plasmática (pm), las mitocondrias y otras organelas membranosas (flechas). Con puntas de flecha se indica el espacio sináptico. 140.000 $\times$. (Cortesía de P. de Camilli.)

quizá con proteínas del citoesqueleto o de la propia membrana plasmática, e intervenir de tal modo en la translocación y aun en la liberación de la vesícula sináptica.

**ORGANIZACION GENERAL
DE LAS FIBRAS NERVIOSAS.
TRANSPORTE AXONICO**

La neurona se halla especialmente diferenciada para la conducción y transmisión de impulsos nerviosos. Después del período embrionario las neuronas no se dividen y permanecen en interfase durante el resto de la vida del organismo. En este tiempo las neuronas pueden experimentar aumentos del volumen, la cantidad y la complejidad de sus prolongaciones y contactos funcionales. Ello reviste gran importancia porque las células nerviosas, además de conducir y transmitir impulsos, almacenan información instintiva y adquirida (reflejos condicionados, memoria), y esta función puede ser realizada con mayor eficacia por un sistema de estructuras más permanentes. En las neuronas, la adaptación a las funciones especializadas se efectúa por medio de diferentes tipos de prolongaciones. El cuerpo celular o pericarión emite una o más prolongaciones cortas, las dendritas, que transportan los impulsos nerviosos centrípetamente, y una más larga, el axón, que conduce los impulsos en sentido centrífugo a la neurona siguiente o al efector. El axón se denomina fibra nerviosa cuando, después de salir de la neurona, es envuelto por las diferentes vainas. El axón concluye ramificándose en el telodendrón o terminación nerviosa. Existen neuronas que tienen solo una dendrita y el axón (*bipolares*) y otras que tienen únicamente el axón (*monopolares*); las restantes, provistas de muchas prolongaciones (*multipolares*), son las más comunes. En los invertebrados prevalecen las neuronas monopolares.

TABLA 7-6. Propiedades de las fibras nerviosas de diferentes tamaños (nervio safeno de gato y de conejo)

Propiedades	Grupo		
	A	B	C
Diámetro de la fibra (µm)	20-1	3	—
Velocidad de conducción (m/seg)	100-5	14-3	2
Duración del potencial de acción (mseg)	0,4-0,5	1,2	2,0
Período refractario absoluto (mseg)	0,4-1,0	1,2	2,0

Según Grundfest (1940) Ann. Rev. Physiol.

El pericarión nervioso se caracteriza por la presencia de cantidades considerables de material basófilo —la sustancia de Nissl— constituido por ribosomas y retículo endoplasmático. Es también característica de la neurona la presencia de un complejo de Golgi bien desarrollado. La gran abundancia de ribosomas se halla en relación con las propiedades biosintéticas del pericarión, el cual mantiene un volumen de citoplasma en las prolongaciones que puede ser muy superior al del cuerpo celular.

7-28. La velocidad de conducción en las fibras nerviosas está relacionada con el diámetro, la presencia de mielina y la longitud del internodo

Las fibras nerviosas son *amielínicas* si están envueltas sólo por las células de Schwann, y *mielínicas* si además se agrega una vaina de mielina, compuesta por un sistema multilaminado lipoproteico. En el sistema autónomo de los vertebrados la mayoría de las fibras nerviosas son amielínicas y se encuentran contenidas en las invaginaciones de la membrana plasmática de las células de Schwann, pero en el resto del sistema nervioso son mucho más comunes las fibras mielínicas. En éstas la vaina se interrumpe a la altura de los *nodos de Ranvier*. La distancia comprendida entre los nodos (*internodo*) varía de acuerdo con el diámetro de la fibra. El internodo es el segmento de mielina producido por una sola célula de Schwann. En la rana mide 0,2 mm en una fibra de 4 µm de diámetro; 1,5 mm en una fibra de 12 µm, y 2,5 mm en una de 15 µm.

Dentro del internodo existen incisuras oblicuas (cónicas) que atraviesan la vaina de mielina y a cuyo nivel las laminillas de mielina son menos compactas. En el nodo la lámina de mielina adopta una disposición muy laxa, de modo que una pequeña zona del axón se pone en contacto directo con el líquido extracelular.

Las fibras mielínicas conducen los impulsos nerviosos a velocidades más rápidas que las amielínicas. El diámetro de la fibra también influye en la velocidad de conducción. Como se observa en la tabla 7-6, las fibras nerviosas pueden ser clasificadas en tres grupos: A, B y C, de acuerdo con su diámetro. Las del último grupo son amielínicas. El diámetro varía entre 20 µm en las fibras del grupo A y menos de 1 µm en las fibras del grupo C, mientras que la velocidad de conducción oscila entre 100 y 2 metros o menos por segundo. En los mamíferos la velocidad de conducción del impulso nervioso mantiene una relación lineal con el diámetro de las fibras mielínicas y con la longitud del internodo.

7-29. El potencial se propaga como una onda de despolarización de amplitud fija

Cuando la fibra nerviosa es estimulada se produce un profundo cambio en las propiedades eléctricas de la membrana y se origina una onda de despolarización que es conducida a lo largo de aquella.

Como se ilustra en la figura 7-31, mediante el registro intracelular se pudo demostrar que la estimulación provoca un cambio brusco en el potencial de reposo. En el sitio estimulado no sólo se produce una despolarización y el potencial pasa de su nivel negativo a cero, sino que lo excede y se vuelve positivo en el interior de la membrana (overshoot).

Utilizando el axón gigante del calamar y un método eléctrico directo, llamado clampeo de voltaje, se pudo medir la cinética de la permeabilidad iónica —en esta técnica se mantiene el voltaje de la membrana a un nivel fijo y se registra el movimiento de iones por la corriente que fluye a través de la membrana—. Con este método, confirmado más tarde con el empleo de marcadores radiactivos, se identificaron dos tipos de canales iónicos, los *canales de Na^+* y los *canales de K^+* , cuya apertura y cierre determina el denominado *potencial de acción*.

En el momento de la estimulación se produce una repentina permeabilidad al Na^+ , que aumenta varios cientos de veces y alcanza su máximo en 100 μseg . Al finalizar este período la membrana se vuelve nuevamente impermeable al Na^+ , pero la permeabilidad al K^+ aumenta y este ion sale de la célula, de modo que la fibra nerviosa se repolariza. En otras palabras, durante la fase de elevación del potencial de acción se verifica la entrada de Na^+ a través de los canales de Na^+ , y en la fase descendente la salida de K^+ a través de los canales de K^+ (fig. 7-31). La restauración del equilibrio iónico insume un tiempo más prolongado después del fenómeno eléctrico.

El potencial de acción que se desarrolla en la fibra nerviosa tiene diversas características. El estímulo suscita una pequeña despolarización localizada en la fibra, que después de alcanzar cierto umbral de activación produce potenciales de acción de igual amplitud. Si se aumenta la intensidad del estímulo, la altura del potencial de acción siempre permanece igual. Esta propiedad se denomina *respuesta de todo o nada*. Otra propiedad del impulso nervioso es la de no decrecer; ello significa que la amplitud del potencial de acción no disminuye y es la misma a todo lo largo de la fibra nerviosa. Este tipo de potencial está bien adaptado para la conducción a largas distancias sin pérdidas (fig. 7-10).

Una vez que un impulso ha pasado a través de cualquier punto de la fibra, comienza allí un *perío-*

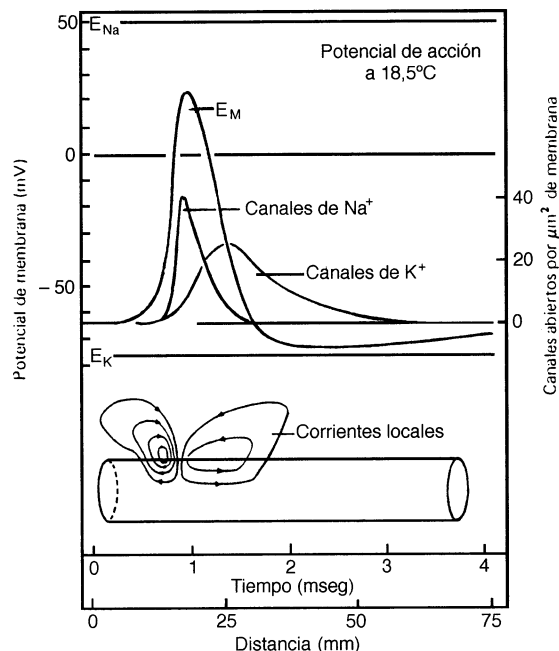


FIG. 7-31. Diagrama que representa los acontecimientos durante la propagación del potencial de acción de acuerdo con el modelo de Hodgkin-Huxley. E_N , potencial de acción en el axón del calamar gigante (squid). Véase la secuencia de la apertura y cierre de los canales de Na^+ y K^+ . La parte inferior muestra la corriente local, y que ésta se extiende hacia la izquierda en la membrana aún no excitada. (De B. Hillie [1981] In: Basic Neurochemistry. Little, Brown, Boston.)

do refractario durante el cual no puede reaccionar a otro estímulo.

Los impulsos nerviosos representan el único lenguaje que utiliza el cerebro para comunicarse a distancia. La información es codificada por una serie de potenciales de acción de amplitud uniforme, en los cuales la única variable es la frecuencia (es decir, el número de impulsos por unidad de tiempo). En el experimento ilustrado en la figura 7-10 se ve que cuanto más intenso es el estímulo del receptor tanto más rápida es la serie de impulsos.

La propagación del impulso nervioso se explica en general por la denominada teoría del circuito local (fig. 7-31). En el punto del estímulo el área se despolariza (exterior negativo) y actúa como receptor hacia el cual fluye la corriente desde las áreas adyacentes. Esta onda de despolarización avanza siguiendo la fibra nerviosa, con una velocidad de conducción característica de cada fibra (tabla 7-6). Mientras esta onda de despolarización avanza, la repolarización es tan rápida que a lo sumo una fracción de la fibra nerviosa —algunos milímetros o centímetros, según la velocidad de conducción— es despolarizada a la vez. En el período de recuperación, por acción de la bomba de sodio-potasio (cap. 4-7), el sodio sale de la célula

y el potasio vuelve a ingresar para restablecer el estado constante.

Aun cuando la teoría precedente acerca de la conducción nerviosa es aplicable a fibras amielínicas, en las mielínicas se presume que los circuitos locales se forman solo a la altura de los nodos. De acuerdo con esta teoría, denominada *saltatoria*, los impulsos son conducidos electrotonicamente a nivel de los internodos, en tanto que en cada nodo el potencial de acción es elevado a la misma altura por medio de mecanismos iónicos.

7-30. La propagación de los potenciales de acción depende de la apertura de canales de sodio y de potasio en la membrana neuronal

En el capítulo 4 introdujimos el concepto de los canales de Na^+ y K^+ y describimos la bomba de Na^+-K^+ (ATPasa Na^+-K^+), cuya función es la de extraer Na^+ del axón y permitir la entrada de K^+ (fig. 4-18). Además de la bomba de Na^+ , los canales de Na^+ y K^+ son los elementos esenciales para explicar las bases moleculares de la propagación del potencial de acción, tanto en el axón como en la membrana muscular.

Es posible imaginar a un canal iónico como un intersticio entre subunidades de proteínas que forman un canal hidrofílico en la membrana del axón. Se piensa que el canal iónico está integrado por dos elementos funcionales: un filtro de selectividad que determina la clase de ion que será translocado y una compuerta que regula el flujo iónico abriendo o cerrando el canal.

En los canales de Na^+ y K^+ del nervio (y del músculo) las compuertas están reguladas por el potencial de membrana, es decir que el mecanismo es propulsado eléctricamente y es controlado por el potencial de membrana, sin necesidad de otra fuente de energía.

En la figura 7-32 se indica que los canales de Na^+ y K^+ se regulan por voltaje. En la condición de reposo (estado constante) tanto los canales de Na^+ como los de K^+ están cerrados. Con la despolarización se abren los de Na^+ , que se cierran en la repolarización; mientras que en este punto se abren los canales de K^+ .

A continuación analizaremos las características de varios tipos de canales:

1. **Canal de sodio.** Es mejor conocido que el de K^+ porque hay varias neurotoxinas que lo afectan de manera diversa. El canal tiene por lo menos tres sitios de unión diferentes para las neurotoxinas. Por ejemplo, la tetrodotoxina (TTX), una toxina producida por un pez japonés del género *Tetrodon*, y la saxitoxina (STX), una toxina de ciertos crustáceos, bloquean por completo los canales de Na^+ . Ambas moléculas, marcadas con tritio, pueden usarse para determinar el número de canales de Na^+ . Existen entre 200 y 500 sitios de unión por μm^2 para TTX en el axón del calamar y en el músculo esquelético de rana, pero se encuentran muchos más en los nodos de Ranvier. La TTX actúa únicamente desde el exterior y se acepta en general que bloquea el sitio de selectividad situado en la superficie externa del axón.

Otro tipo de bloqueadores de los canales de Na^+ son los anestésicos locales, como la lidocaína y la

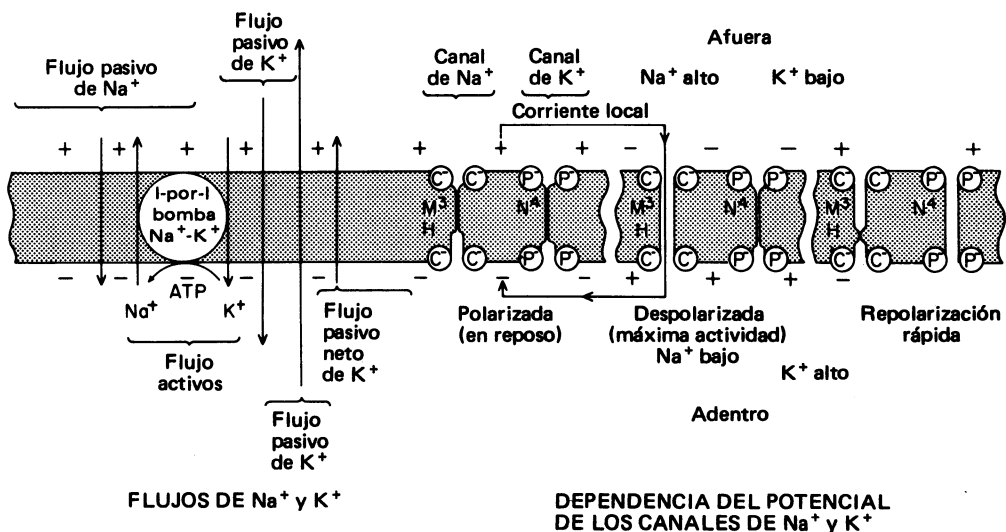


FIG. 7-32. Diagrama de la estructura molecular de la membrana plasmática en relación con el transporte iónico durante el potencial de acción. Se indican los tipos de flujo que mantienen el potencial de reposo. Con la despolarización se abren primero los canales de Na^+ y luego los de K^+ . (Cortesía de J. W. Woodbury.)

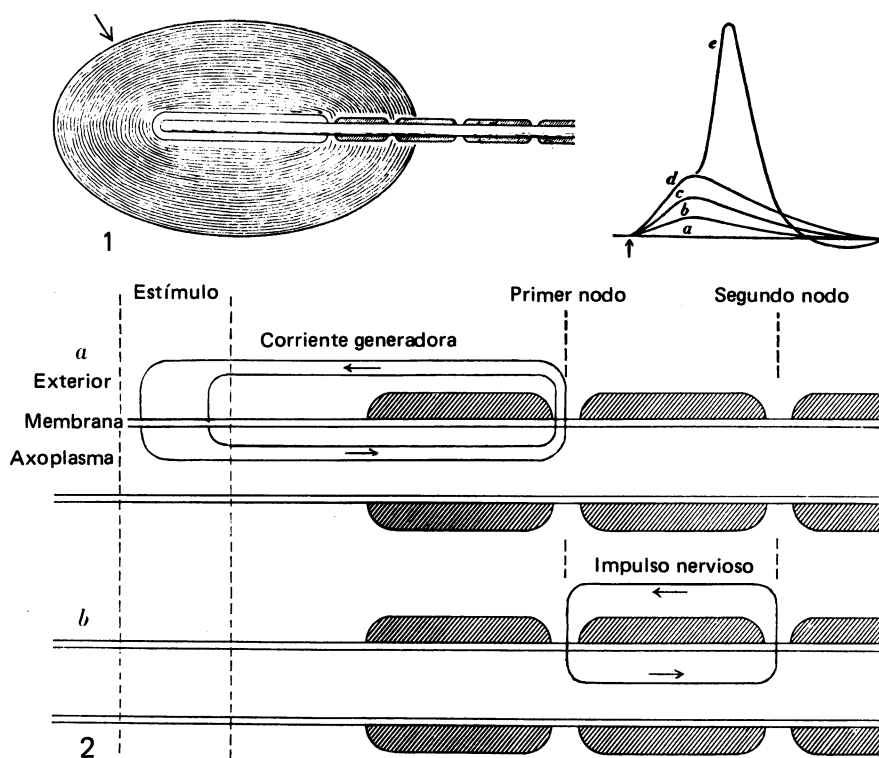


FIG. 7-33. 1. Corpúsculo de Pacini con la terminación nerviosa rodeada de múltiples laminillas. El estímulo a nivel de la flecha suscita un potencial generador que aumenta en amplitud (a-d) hasta que produce un impulso nervioso ("todo o nada") (e). 2. Mecanismo de transducción. El estímulo ocasiona una caída en la resistencia de la membrana con transferencia iónica. Véase la corriente generadora inducida por el estímulo (a) y el impulso nervioso (b) que se origina en el primer nodo. (Cortesía de W. R. Loewenstein.)

procaína, que se usan en clínica. Estas sustancias son aminas liposolubles que actúan bloqueando la conducción nerviosa, efecto que se debe a la inactivación del mecanismo de regulación de los canales de Na^+ . Otras drogas, como la batracotoxina, la aconitina, la veratridina, etc., abren los canales de Na^+ o impiden que se cierren.

Un tercer tipo de neurotoxina es la toxina de escorpión, que retarda la inactivación del canal.

A partir de estudios de clampeo de voltaje se pudo demostrar que un solo canal de Na^+ puede translocar 4.000 iones Na^+ por milisegundo.

Se aisló y purificó el canal de Na^+ del cerebro de rata, de elevado peso molecular, formado por una sola cadena polipeptídica con cuatro unidades repetitivas (I a IV). Cada una de estas unidades contiene cinco segmentos hidrofóbicos y un segmento S_4 con una gran carga positiva —uno de cada tres residuos es lisina o arginina—, que posiblemente intervengan sensibilizando el conducto al potencial de membrana.

2. Canal de potasio. La conductancia al potasio es inhibida selectivamente por iones tetraetilamonio (TEA). En el axón gigante de calamar el TEA bloquea sólo el canal de K^+ desde el interior.

Esta molécula tiene el mismo diámetro que el ion potasio hidratado. Este y otros hallazgos llevaron a postular que el canal axónico de K^+ tiene forma de embudo. La parte ancha del embudo mira hacia el interior y posee un diámetro aproximado de 0,8 nm, que es suficiente para el ion potasio lo mismo que para el TEA. El filtro de selectividad, que corresponde a la parte estrecha del embudo, sólo tiene unos 0,3 nm de diámetro, es decir que únicamente permite el pasaje del ion potasio deshidratado. Se cree que en la parte más ancha del canal hay un sitio hidrofóbico. El mecanismo de compuerta, sensible a cambios del potencial de membrana, pudo ser localizado en el interior del canal. Por otra parte, en el axón gigante del calamar (*squid*) se calculó la existencia de 70 canales por μm^2 .

3. Canales de Ca^{2+} . Además de los canales de Na^+ y K^+ , la presencia de canales de Ca^{2+} es muy importante ya que, como se ha visto en varios capítulos, la entrada de Ca^{2+} desempeña un papel fundamental en muchas funciones celulares, como por ejemplo la exocitosis, la contracción, etc. En la membrana neuronal hay cierto número de canales de Ca^{2+} que son activados por el potencial de

membrana y que resultan esenciales para la liberación del neurotransmisor. Los canales de Ca^{2+} pueden ser bloqueados por el verapamilo o por la droga relacionada D-600, así como por iones bivalentes como Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} y Ni^{2+} aplicados desde el exterior de la célula. En la actualidad se usan una serie de drogas basadas en el núcleo 1,4-dihidropiridina (por ejemplo, nifedipina) como bloqueadores de los canales de Ca^{2+} ; éstas se emplean en terapéutica para controlar la angina de pecho y la hipertensión arterial ya que relajan el músculo liso arteriolar.

Como ya se vio, además de estos canales dependientes de voltaje hay otros que son activados por la interacción con neurotransmisores. Estos son los *canales ligados a receptores* y el mejor conocido es el receptor nicotínico.

7-31. En los receptores fisiológicos y en las sinapsis los potenciales son graduados y no se propagan

Los estudios fisiológicos demostraron que, además de la respuesta de todo o nada, en el tejido nervioso existe otro tipo de actividad eléctrica. Esta es, con mucho, la más frecuente en el sistema nervioso central y se la conoce como *respuesta graduada*.

En la respuesta graduada, característica de los receptores fisiológicos y de las sinapsis (fig. 7-10), el impulso no se propaga y la amplitud varía con la intensidad del estímulo. Tanto los potenciales generadores hallados en los receptores fisiológicos como los potenciales sinápticos constituyen respuestas graduadas.

Cuando un receptor periférico —como el corpúsculo de Pacini o un receptor de tensión (huso neuromuscular)— es estimulado mecánicamente, se registra un potencial local, graduado y decreciente, cuya amplitud y duración dependen de la intensidad y duración del estímulo.

En el caso del corpúsculo de Pacini, se pueden extraer la mayoría de las laminillas conectivas que rodean la terminación nerviosa sin alterar el potencial generador (fig. 7-33). Parecería, pues, que el transductor biológico susceptible de transformar la energía mecánica (presión) en energía eléctrica (potencial generador) se localiza en la parte neural de la terminación. Probablemente la deformación mecánica de la terminación produzca una modificación en la permeabilidad de la membrana, con entrada de iones y despolarización parcial. En el corpúsculo de Pacini, el impulso nervioso comienza en el primer nodo de Ranvier (fig. 7-33).

La intensidad del estímulo sensorial se refleja en la amplitud del potencial generador y éste, a su vez, en la frecuencia de la señal propagada —cuanto

más intenso es el potencial generador, mayor es la frecuencia—. De este modo, la información recibida es codificada para la conducción a lo largo de las fibras nerviosas en forma de un tren o una salva de impulsos (fig. 7-10).

BIBLIOGRAFIA

- Alkon D. L. and Rasmussen H. (1988) A spatial-temporal model of cell activation. *Science* 239:998.
- Archer T. K. et al. (1995) Steroid hormone receptor status defines the MMTV promoter chromatin structure in vivo. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53:421.
- Armstrong C. M. (1981) Sodium channels and gating currents. *Physiol. Rev.* 61:644.
- Armstrong C. M. (1992) Voltage-dependent ion channels and their gating. *Physiol. Rev. (Suppl.)* 72:55.
- Armstrong D. L. (1989) Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca^{2+} -activated phosphatase in mammalian brain. *Trends Neurosci.* 12:117.
- Barinaga M. (1995) Two major signaling pathways meet at MAP-kinase. *Science* 269:1673.
- Barrantes F. (1993) Structural-functional correlates of the nicotinic acetylcholine receptor and its lipid microenvironment. *FASEB J.* 7:1460.
- Bell R. M. (1986) Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 45:631.
- Berridge M. J. (1993) Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* 361:315.
- Bossmeyer D. (1995) Protein kinases. Structure and function. *FEBS Lett.* 369:57.
- Bourne H. R., Sanders D. A. and McCormick F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanisms. *Nature* 349:117.
- Bourne H. R. and Nicoll R. (1993) Molecular machines integrate coincident synaptic signals. *Cell/Neuron* 72, 10:65.
- Bredt D. S. and Snyder S. H. (1992) Nitric oxide: A novel neuronal messenger. *Neuron* 8 (1):8.
- Buckley B. J., Mirza Z. and Whorton A. R. (1995) Regulation of Ca^{2+} -dependent nitric oxide synthase in bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.* C. Physiol. 38:C757.
- Burazin T. C. D and Gundlach A. L. (1995) Localization of NO synthase in rat brain by [^3H]-L-N-G-nitro-arginine autoradiography. *Neuroreport* 6:1842.
- Campbell J. S. et al. (1995) The MAP kinase cascade. *Rec. Prog. Horm. Res.* 50:131.
- Charbonneau H. and Tonks N. K. (1992) A thousand and two protein phosphatases? *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:463. (Véase Hunter, 1987.)
- Cohen P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58:453.
- Das S. and Kumar K. N. (1995) Nitric oxide: Its identity and role in blood pressure control. *Life Sci.* 57:1547.
- De Camilli P. (1995) Molecular mechanisms in synaptic vesicle recycling. *FEBS Lett.* 369:3.
- De Robertis E. (1964) *Histophysiology of Synapses and Neurosecretion*. Pergamon Press, Oxford.
- De Robertis, E. (1967) Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region. *Science* 156:907.
- De Robertis E. (1975) *Synaptic Receptors: Isolation and Molecular Biology*, pp. 1-387. Marcel Dekker, New York.
- Esteban J. M., Ahn C., Metha P. and Battifora H. (1994) Biological significance of quantitative estrogen receptor immunohistochemical assay by an image analysis in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 102:158.
- Evans R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889.
- Ferreira A., Han H. Q., Greengard P. and Kosik K. S. (1995) Suppression of synapsin II inhibits the formation and main-

- tenance of synapses in hippocampal culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9225.
- Fischer E. H. et al. (1991) Protein tyrosine phosphatases: A diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* 253:401.
- Galzi J. L. (1991) Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: From electric organ to brain. *Ann. Rev. Pharmacol.* 31:37.
- Ghosh A. and Greenberg M. E. (1995) Calcium signaling in neurons: Molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268:239.
- Gilman A. G. (1995) G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci. Rep.* 15:65.
- Heinig J. A. et al. (1995) The appearance of proopiomelanocortin early in vertebrate evolution. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99:137.
- Himpens B., Missiaen L. and Casteels R. (1995) Ca^{2+} homeostasis in vascular smooth muscle. *J. Vasc. Res.* 32: 207.
- Hodgkin A. L. and Huxley A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (London)* 117: 500.
- Huges T. E. (1995) Transmembrane topology of the glutamate receptors. *J. Mol. Neurosci.* 5:211.
- Hunter T. (1987) A thousand and one protein kinases. *Cell* 50:823. (Véase Charbonneau, 1992.)
- Hunter T. and Karin M. (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70:375.
- Jacob J. M. and O'Donoghue D. L. (1995) Direct measurement of fast axonal transport rates in corticospinal axons of the adult rat. *Neurosci. Lett.* 197:17.
- Jessel T. M. and Kandel E. R. (1993) Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* 72 (Suppl.1):1.
- Karin M. and Hunter T. (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation: Signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* 5:747.
- Katz B. and Miledi R. (1970) Membrane noise produced by acetylcholine. *Nature* 226:962.
- Kaziro Y., Itoh H., Kozasa T., Nakafuku M. and Satoh T. (1991) Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 60:349.
- Kentroli S. and Vernadakis A. (1995) Early neuroblasts are pluripotent: Colocalization of neurotransmitters and neuropeptides. *J. Neurosci. Res.* 41:696.
- Krieger D. T. (1983) Brain peptides: What, where and why? *Science* 222:975.
- Lee M. Y. et al. (1995) Light- and electron-microscopic study of substance P-immunoreactive neurons in the guinea pig retina. *Cell Tissue Res.* 28:261.
- Lefkowitz R. J. (1995) G proteins in medicine. *N. Engl. J. Med.* 332:186.
- Lindler M. E. and Gilman A. G. (1992) G proteins. *Sci. Am.* 267:36.
- Llinás R. R. (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: Insights into central nervous system function. *Science* 242:1654.
- Lord J. M. and Pongracz J. (1995) Protein kinase C: A family of isoenzymes with distinct roles in pathogenesis. *J. Clin. Pathol.* 48:M57.
- Lu K. P. and Means A. R. (1993) Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endoc. Rev.* 14:40.
- Malarkey K. et al. (1995) The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 309:361.
- Means A. R. (1988) Molecular mechanism of action of calmodulin. *Rec. Prog. Horm. Res.* 44:223.
- Minami N. and Satoh M. (1995) Molecular biology of the opioid receptors: Structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.* 23:121.
- Mintz I. M., Sabatini B. L. and Regehr W. G. (1995) Calcium-dependent transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 15:675.
- Mitchell R. H. (1992) Inositol lipids in cellular signalling mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 17:274.
- Mitchison T. and Kirschner M. (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1:761.
- Mochly-Rosen D. (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268:247.
- Moncada S., Palmer R. and Higgs E. A. (1991) Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43 (2):109.
- Nardulli A. M., Grobner C. and Cotter D. (1995) Estrogen receptor-induced DNA bending: Orientation of the bend and replacement of an estrogen response element with an intrinsic DNA bending sequence. *Mol. Endocrinol.* 9: 1064.
- Nicoll R. A., Malenka R. C. and Kauer J. A. (1990) Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 70:513.
- Nishida E. and Gotoh Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* 18:128.
- Palay S. L. (1958) The morphology of synapses in the central nervous system. *Exp. Rec. Res. (Suppl.)* 5:275.
- Pawson T. (1993) Signal transduction. A conserved pathway from the membrane to the nucleus. *Dev. Gen.* 14:333.
- Pawson T. and Gish G. D. (1992) SH₁ and SH₂ domains. *Cell* 71:359.
- Perney T. M. and Kaczmarek L. K. (1991) The molecular biology of K⁺ channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:663.
- Rasmussen H. (1986) The calcium messenger system. *N. Engl. J. Med.* 314:1164.
- Rasmussen H. (1989) The cycling of calcium as an intracellular messenger. *Sci. Am.* 261:66.
- Raymond J. R. (1995) Multiple mechanisms of receptor-G protein signaling specificity. *Am. J. Physiol.; Renal Physiol.* 38:F141.
- Rusakov D. A. and Stewart M. G. (1995) Quantification of dendritic spine populations using image analysis and a tilting dissector. *J. Neurosci. Meth.* 60:11.
- Ryan T. A., Reuter H., Wendland B., Schweizer F. E., Tsien R. W. and Smith S. J. (1993) The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons. *Neuron* 11:713.
- Sakman B. (1992) Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Science* 256:503.
- Schemann M. and Schaaf C. (1995) Differential projection of cholinergic and nitroindergic neuron in the myenteric plexus of guinea pig stomach. *Am. J. Physiol.* 32:G186.
- Schlessinger J. and Ullrich A. (1990) Growth factor signaling by receptor with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203.
- Schulman H. and Lou L. L. (1989) Multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase: domain structure and regulation. *TIBS* 14:62.
- Sherman M. R. and Stevens J. (1984) Structure of mammalian steroid receptors: evolving concepts and methodological development. *Ann. Rev. Physiol.* 46:83.
- Simol M. I., Strathmann M. P. and Gautham N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252: 803.
- Sivilotti L. and Colquhoun D. (1995) Acetylcholine receptors: Too many channels, too few functions. *Science* 269: 1681.
- Spiegel A. M., Weinstein L. S. and Shenker A. (1993) Abnormalities in G protein-coupled signal transduction pathways in human disease. *J. Clin. Invest.* 92:1119.
- Stephenson F. A. (1995) The GABA(A) receptors. *Biochem. J.* 310:1.
- Südhof T. C. (1994) Synaptic vesicles and exocytosis. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:219.
- Tallman J. F. and Gallager D. W. (1985) The GABAergic system. *Annu. Rev. Neurosci.* 8:21.
- Taniguchi T. (1995) Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268:251.

- Taylor S. S. (1989) cAMP-dependent protein kinase: Model for an enzyme family. *J. Biol. Chem.* 264:8443.
- Thomas P. and Almers W. (1992) Exocytosis and its control at the synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2:308.
- Unwin N. (1989) The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron* 3:665.
- Unwin N. (1993) Neurotransmitter action: opening of ligand-gated ion channels. *Cell* 72 (Suppl.):31.
- Unwin N. (1993) Nicotinic acetylcholine receptor at a 0,9 nm resolution. *J. Mol. Biol.* 229:1101.
- Vaca L. and Kunze D. L. (1995) IP₃-activated Ca²⁺ channels in the plasma membrane of cultured vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.; C. Physiol.* 38:C733.
- Vilaró M. T., Palacios J. M. and Mengod G. (1995) Neurotransmitter receptor histochemistry: The contribution of in situ hybridization. *Life Sci.* 57:1141.
- Vouldoukis I. et al. (1995) The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcγRII/CD23 surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7804.
- Walsh M. J. and Kuruc N. (1992) The postsynaptic density: Constituent and associated proteins characterized by electrophoresis, immunoblotting, and peptide sequencing. *J. Neurochem.* 59:667.
- Weinberg J. B. et al. (1995) Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): Analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86:1184.
- Whitfield J. F., Bird R. P., Chakravarty B. R., Isaacs R. J. and Morley P. (1995) Calcium: Cell cycle regulator, differentiator, killer, chemopreventor, and maybe, tumor promoter. *J. Cell. Biochem. (Suppl.)* 22:74.
- Yeh H. H. and Grigorenko E. V. (1995) Deciphering the native GABA(A) receptor: is there hope? *J. Neurosci. Res.* 41: 567.

8 / Sistema de endomembranas

Roberto Ponzio

En el capítulo 1 se mencionó que la célula eucariótica tiene un alto grado de organización estructural. Tanto en las células vegetales como en las animales, el citoplasma es atravesado por un complejo sistema laberíntico de túbulos, vesículas y sacos aplanados constituidos por membranas y extensamente comunicados entre sí. Esto debe ser interpretado tridimensionalmente como una vasta red membranosa que subdivide al citoplasma en dos *compartimientos* fundamentales: uno comprendido dentro de las membranas y el otro situado por fuera de ellas (es decir, la matriz citoplasmática o citosol).

La enorme superficie de membranas internas —que puede ser hasta 50 veces mayor que la de la membrana plasmática— proporciona a las células no solamente un soporte para la localización ordenada de múltiples sistemas enzimáticos diferentes, sino que les provee de subcompartimientos funcionales cerrados que constituyen los diferentes *organoides membranosos especializados*, cada uno de ellos con estructura, dotación enzimática y propiedades funcionales que lo caracterizan.

Sin estos compartimientos, organizados y separados, se mezclarían al azar miles de enzimas, sus sustratos, cofactores y reguladores, y sobrevendría el caos bioquímico que el estudiante puede imaginarse.

Una célula eucariótica ya no puede ser considerada entonces como una simple bolsa que contiene enzimas, ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) y solutos rodeados por una membrana externa, como en la bacteria más primitiva. Como estudiaremos en este capítulo, numerosos compartimientos rodeados de membrana son responsables de funciones celulares vitales, entre las cuales se encuentran la separación y asociación de sistemas enzimáticos, la digestión intracelular de

sustancias, la distribución de cada una de las miles de proteínas diferentes de la célula hacia sus destinos finales, la regulación de potenciales de membrana, de gradientes iónicos, de diferentes valores de pH intracelular y otras manifestaciones de heterogeneidad celular. Además, existen pruebas de que las enzimas están organizadas espacialmente, formando sistemas multienzimáticos dentro del armazón de las endomembranas celulares.

MORFOLOGIA GENERAL DEL SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS

En el capítulo 1-19 se introdujo el concepto de *sistema vacuolar citoplasmático* o *sistema de endomembranas* para denominar al conjunto de orgánoides membranosos funcionalmente interconectados. Comprende el *retículo endoplasmático* (RE) con sus dos porciones *granular* y *agranular* (o rugoso y liso, respectivamente); la *envoltura nuclear* o *carioteca* (que será estudiada en el capítulo 10), y el *aparato de Golgi* junto con sus elementos relacionados, como *endosomas*, *lisosomas*, *gránulos* o *vesículas secretorias* y todo un complejo *sistema vesicular* de endocitosis y tránsito endomembranoso (fig. 8-1).

Pese a estar delimitados por membranas, las mitocondrias, los cloroplastos y los peroxisomas no son considerados componentes del sistema vacuolar, debido principalmente a consideraciones evolutivas y a características especiales de estos orgánoides que serán analizadas en los capítulos 9 y 19.

La figura 8-2 muestra que el sistema de endomembranas representa una especie de barrera que separa los compartimientos citoplasmáticos. Este esquema resalta las dos caras de cada membrana: la citoplasmática (o citosólica) y la luminal (endovacuolar o extracelular).

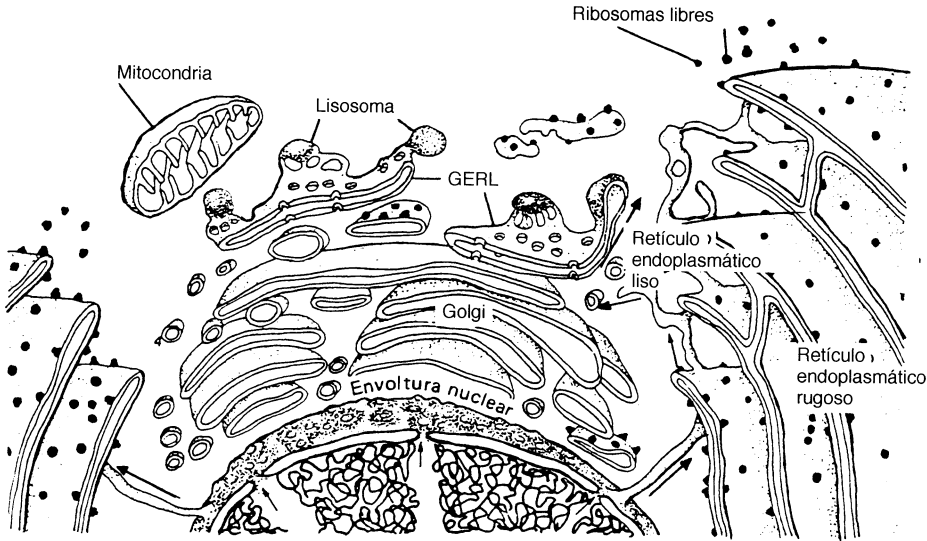


FIG. 8-1. Esquema tridimensional del sistema de endomembranas de la célula. El núcleo con sus fibras cromáticas muestra canales intercromáticos (flechas) que conducen a los poros nucleares; adviértase la organización en doble membrana de la envoltura nuclear. Las cisternas del retículo endoplasmático rugoso están interconectadas y tienen ribosomas unidos a la superficie externa. Algunas de estas cisternas se extienden por medio de túbulos de retículo endoplasmático liso. El aparato de Golgi muestra la región del retículo trans-Golgi (GERL). Las flechas grandes indican la probable relación dinámica entre las diversas porciones del sistema de endomembranas.

La cara citoplasmática o citosólica de las membranas celulares está en contacto con la matriz citoplasmática, de modo que la superficie interna de la membrana plasmática y la externa de los orgánulos intracelulares (como el retículo endoplasmá-

tico, el aparato de Golgi, los lisosomas, los peroxisomas o los gránulos de secreción) son topológicamente equivalentes. De la misma manera, la cara luminal de los orgánulos (en contacto con las cavidades del sistema vacuolar) es el equivalente to-

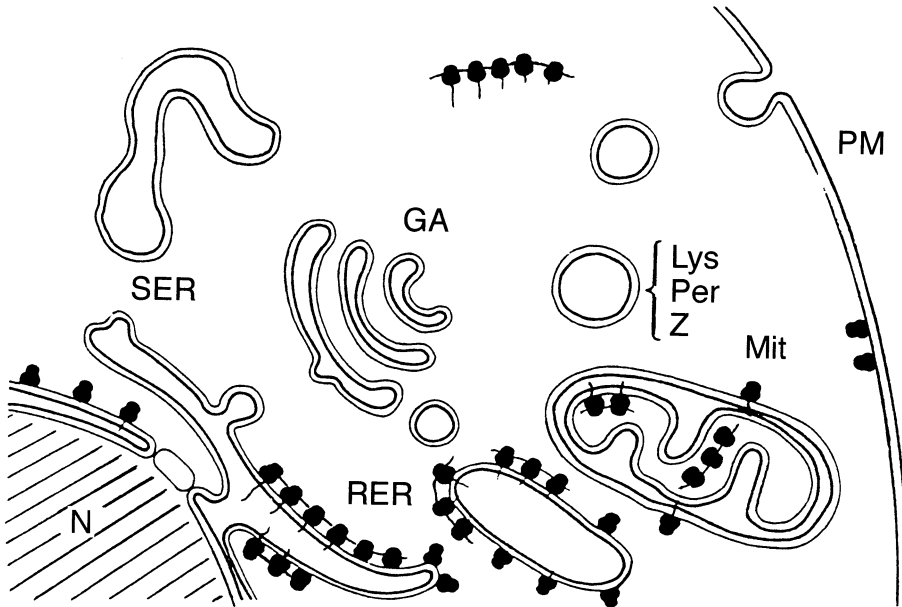


FIG. 8-2. Equivalencia topológica de la membrana plasmática y los diversos componentes del sistema de endomembranas. En cada membrana las caras luminales se indican por una línea más gruesa y las caras citosólicas por líneas finas. Los ribosomas se hallan siempre en el lado citosólico o de la matriz. N, núcleo; GA, aparato de Golgi; Lys, lisosomas; Mit, mitocondria; RER, retículo endoplasmático rugoso; Per, peroxisoma; PM, membrana plasmática; SER, retículo endoplasmático liso; Z, gránulo de zimógeno. (Cortesía de D. D. Sabatini y G. Kreibich [1976].)

pológico de la superficie extracelular de la membrana plasmática.

Como sucede en la membrana plasmática, las endomembranas están formadas por una bicapa lipídica de 5-6 nm, que además de tener proteínas transmembranosas también posee proteínas intrínsecas y extrínsecas expuestas hacia una u otra cara. Como vimos en el capítulo 4, los oligosacáridos de membrana se proyectan hacia el exterior celular y hacia las cavidades del sistema endomembranoso.

RETICULO ENDOPLASMATICO

8-1. El retículo endoplasmático (RE) puede ser rugoso (RER) o liso (REL)

Hace casi un siglo, los histólogos clásicos pudieron visualizar con el microscopio óptico ciertas estructuras filamentosas u homogéneas, intensamente basófilas, en el citoplasma basal de las células glandulares serosas del páncreas y de la parótida, a las que denominaron *ergastoplasma*. Décadas después, el empleo de métodos histoquímicos y de absorción UV a 260 nm (cap. 3-6) permitió reconocer la presencia de *ribonucleoproteínas* en esas áreas basófilas, que fueron interpretadas como sitios de síntesis de materiales celulares.

Para la misma época, el desarrollo de los métodos de *fraccionamiento celular* (cap. 3-8) permitió aislar y analizar una fracción citoplasmática muy rica en ribonucleoproteínas, que fue denominada *fracción microsómica* o *microsomas*. En 1945 Porter —uno de los precursores del empleo del microscopio electrónico para la observación de células—, al estudiar delgadas extensiones de fibroblastos en cultivo, describió un delicado retículo anastomosado que se extendía por todo el citoplasma salvo en una pequeña zona cortical —o ectoplasma (cap. 5)— (fig. 8-3), al que consideró un nuevo organoide y le dio el nombre descriptivo de *retículo endoplasmático*, sugiriendo que podría corresponder a los microsomas del fraccionamiento celular y, por lo tanto, a las áreas basófilas citoplasmáticas o ergastoplasma. Trabajos posteriores de otros investigadores y del mismo Porter junto a Palade permitieron establecer firmemente la existencia del retículo endoplasmático rugoso como un organoide membranoso, con su cara citosólica dotada de numerosas partículas denominadas *ribosomas*, responsables de su basofilia.

También se reconoció la existencia de una variedad de retículo endoplasmático desprovisto de ribosomas, a menudo en continuidad con el anterior, constituido por formaciones membranosas tubulares ramificadas y anastomosadas. A esta variedad de retículo sin ribosomas, que ocupa zonas del citoplasma donde el microscopio óptico no revela

ninguna estructura identificable, se le dio el nombre de *retículo endoplasmático liso* (REL), y posee características especiales que analizaremos luego.

8-2. El retículo endoplasmático rugoso (RER) es responsable de la síntesis y segregación de proteínas no citosólicas

Esta variedad de retículo endoplasmático, que es el que posee ribosomas, es en general el organoide más extenso de gran número de células, aunque existen variaciones importantes de acuerdo con el tipo celular. A menudo es escaso en los huevos y en la células embrionarias o indiferenciadas, pero suele aumentar con el grado de diferenciación.

El RER está especialmente desarrollado en las células que participan activamente en la síntesis de proteínas para su secreción. Como vimos, por lo general ocupa las regiones del citoplasma correspondientes al ergastoplasma, es decir, las que con el microscopio óptico aparecen basófilas debido a la presencia de ribosomas, y más específicamente, al ARN que éstos contienen.

La tabla 8-1 indica el volumen relativo y las áreas de las membranas que constituyen los principales compartimientos de la célula pancreática; se observa la gran superficie membranosa del RER. Se calcula también que la superficie total de las membranas contenidas en 1 cm³ de tejido hepático es de aproximadamente 11 m², y que dos terceras partes de esa superficie corresponden al retículo endoplasmático rugoso.

Las células que se dividen con rapidez, como las embrionarias y las cancerosas, tienen un citoplasma fuertemente basófilo debido a su abundancia de ribosomas, pero el RE está poco desarrollado ya que en estos casos los ribosomas no suelen estar adheridos a membranas sino libres en el citosol.

Ese es también el caso de los eritroblastos, que producen principalmente proteínas destinadas a

TABLA 8-1. Volúmenes relativos y áreas de la membrana de los compartimientos secretorios en células del páncreas exocrino del cobayo

Compartimiento	Volumen citoplasmático relativo (%)	Area de la membrana (μm ² /célula)
RER	~20	~8.000
Complejo de Golgi	~ 8	~1.300
Vacuolas condensantes	~ 2	~ 150
Gránulos secretorios	~20	~ 900
Plasmalema apical	~	~ 30
Plasmalema basolateral	~	~ 600

De Jamieson y Palade (1977).

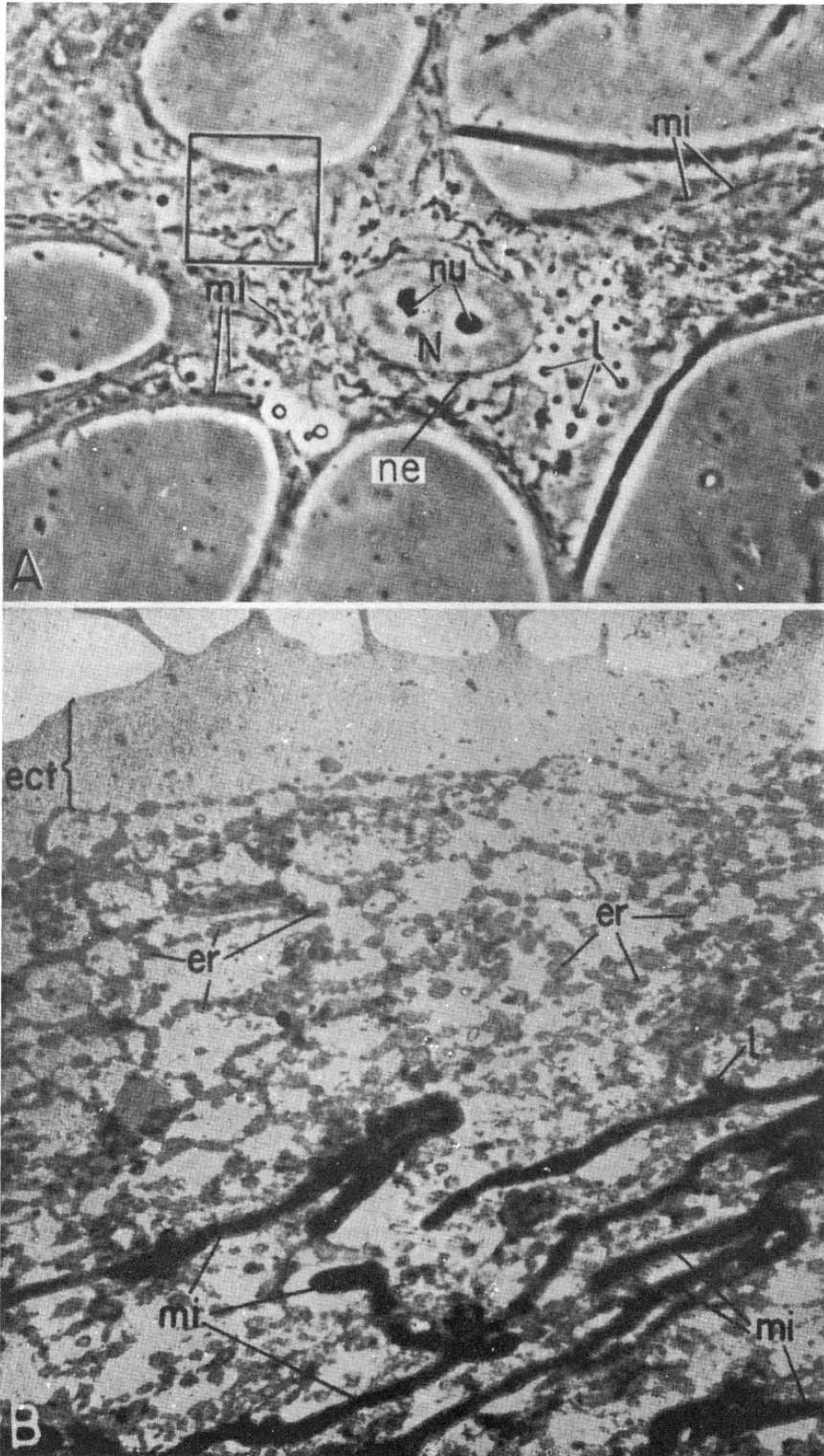


FIG. 8-3. A. Célula viva en cultivo de tejidos observada con el microscopio de contraste de fases. nu, nucléolo; mi, mitocondria; ne, membrana nuclear; l, lípidos. La zona indicada en el recuadro es aproximadamente similar a la que se ve en B. (Cortesía de D. W. Fawcett.) B. Micrografía electrónica de la región marginal de un fibroblasto de rata cultivado, semejante a A, que incluye la zona externa homogénea o ectoplasma (ect) y una zona más profunda (endoplasma) del citoplasma. mi, mitocondrias filamentosas; er, retículo endoplasmático. 7.000×. (Cortesía de K. R. Porter.)

permanecer en el citosol (hemoglobina); en ellos el retículo es poco desarrollado o está ausente, dado que la síntesis de hemoglobina se efectúa en sus numerosos ribosomas libres.

Como veremos, la asociación o no de los ribosomas a las membranas condiciona el destino ulterior de las proteínas sintetizadas: las producidas en ribosomas libres permanecen inicialmente en el citosol, mientras que las sintetizadas en el RER pasan

al interior del sistema vacuolar para ser integradas a membranas, a otros compartimientos, o ser liberadas al exterior. Por ejemplo, en las células que producen gran cantidad de proteínas para secreción, como las del ácino pancreático, el RER está particularmente desarrollado y se presenta como pilas de grandes cisternas aplanadas, paralelas (fig. 8-4, A), cubiertas de ribosomas, que ocupan las regiones basales y laterales de la célula.

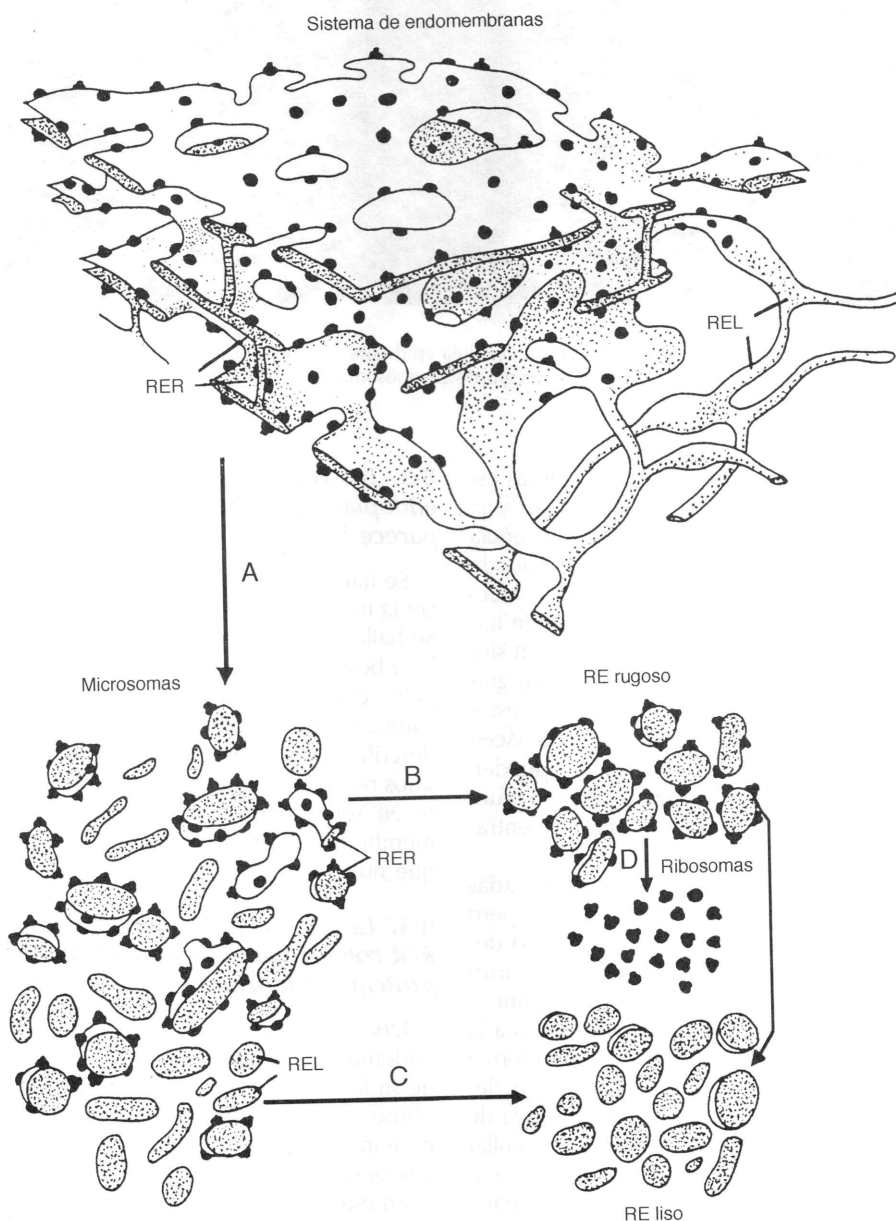


FIG. 8-4. Esquema tridimensional del retículo endoplasmático. El RER está constituido por cisternas aplanadas paralelas interconectadas, cubiertas por ribosomas; el REL carece de ribosomas y sus membranas forman tubos irregulares anastomosados; obsérvese la continuidad directa entre los dos sistemas. Por los procedimientos de homogeneización y centrifugación diferencial (A) se obtiene la fracción microsómica, que a su vez puede ser subfraccionada en microsomas rugosos (B) y lisos (C); en D, separación de los ribosomas. RER, retículo endoplasmático rugoso; REL, retículo endoplasmático liso.

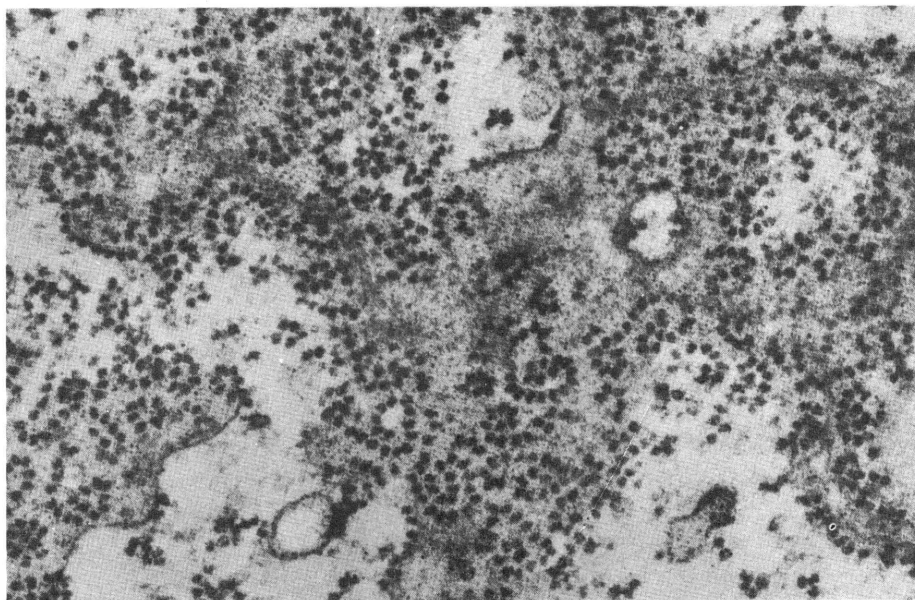


FIG. 8-5. Micrografía electrónica del polo radicular de la célula epidérmica de una raíz. La sección tangencial a través de la membrana del retículo endoplasmático rugoso muestra grupos de ribosomas (polirribosomas) dispuestos en espiral. 57.000×. (Cortesía de H. T. Bonnett [h.] y E. H. Newcomb.)

En ocasiones, las membranas de las cisternas están prácticamente adosadas entre sí y dejan una cavidad casi virtual, pero con mayor frecuencia existe entre ellas un verdadero espacio, que puede estar ocupado por un material de opacidad electrónica variable (fig. 1-12). Esta cavidad puede hallarse sumamente distendida en las células con síntesis proteica muy activa pero que no forman gránulos secretorios, como los plasmocitos. En estos casos se observa un precipitado floculento grisáceo en el interior de las cisternas. En ocasiones pueden visualizarse gránulos intracisternales y aun pequeños cristales proteicos, debido a la alta concentración de proteína.

La disposición en cisternas paralelas, conectadas entre sí y con la carioteca, es típica del RER, pero en las células donde este organoide está poco desarrollado puede tener un aspecto de túbulos irregulares anastomosados. Como se mencionó antes, los ribosomas están constantemente adheridos a la superficie externa. Estos no se encuentran en forma individual sino como *polirribosomas* (también denominados polisomas) unidos por una molécula de ARN mensajero (caps. 12 y 13) a modo de collar de perlas, y a menudo forman figuras espirales o en "roseta" (fig. 8-5) adheridos a la membrana siempre por su subunidad mayor (60S) (fig. 8-6).

Sin embargo, cabe señalar que los ribosomas unidos al RE se separan e intercambian sus subunidades con las del citosol en cada ciclo de síntesis proteica (cap. 13).

8-3. Los ribosomas se unen con el retículo endoplasmático por la subunidad 60S y esto parece implicar a las riboforinas

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la unión selectiva de los ribosomas al RE rugoso. Se halló que esta parte del RE, cuando se le quitan los ribosomas, retiene la capacidad de volver a fijarlos con gran afinidad, mientras que el RE liso carece siempre de esta propiedad. Más adelante describiremos en las membranas la existencia de sitios receptores especiales para ribosomas, que parecen relacionarse con dos glucoproteínas transmembranosas, las *riboforinas I y II*, de 65 y 63 kDa, que no se encuentran en el RE liso.

8-4. La asociación o no de los ribosomas al RER condiciona el destino inicial de la proteína sintetizada

Una de las principales funciones del sistema de endomembranas consiste en la segregación, dentro de su luz, de las proteínas que son sintetizadas por ribosomas que se unen a la membrana. Luego estas proteínas son procesadas y canalizadas hacia sus diferentes destinos dentro o fuera de la célula.

En este capítulo analizaremos los posibles mecanismos por los cuales cada una de las miles de proteínas sintetizadas en una célula van a ser translocadas selectivamente a su destino final, ya sea al exterior, a los diferentes compartimientos celulares (por ejemplo núcleo, mitocondrias, lisosomas, clo-

roplastos, etc.) o a las membranas donde actúan. Explicaremos más abajo que este tránsito selectivo se debe a la presencia de secuencias especiales de aminoácidos (señales moleculares) en cada proteína, de modo tal que están genéticamente determinadas. El primer paso para la separación de las proteínas en dos grandes grupos con destinos diferentes está dado por la asociación o no de los ribosomas a las membranas del retículo endoplasmático rugoso.

Como veremos en los capítulos correspondientes, el proceso de síntesis de cualquier proteína comienza en el núcleo celular con la activación del *gen* respectivo, con cuya información se copia (transcribe) una molécula de ARN que luego de ser procesada en el núcleo pasa al citoplasma con el nombre de *ARN mensajero* (ARNm), portando una información similar a la del *gen* correspondiente para la síntesis de una determinada proteína. Vale decir que lo que sale del núcleo es la *información génica* (o mensaje génico, de allí el nombre del ARNm) y no el ADN, que siempre permanece protegido dentro de aquél.

El mensaje génico del ARNm es interpretado en el citoplasma (mediante un proceso llamado *traducción*) por la acción conjunta de los ribosomas, los *ARN de transferencia* (ARNt), que transportan a los diferentes aminoácidos, y una multitud de enzimas y factores proteicos que se analizarán oportunamente. No se conoce con certeza el número total de genes existentes ni de proteínas diferentes que son capaces de producir las células humanas. El número de genes se estima en algo menos de 100.000, y se cree que una célula activa diferenciada podría producir unos 10.000 péptidos distintos.

La síntesis de todos ellos, a partir de la información del ARNm correspondiente, comienza siempre en ribosomas libres en el citosol. En muchas ocasiones la síntesis se completa en el citosol sin que los *ribosomas libres* tengan relación alguna con las membranas. En otros casos, a poco de comenzada la producción de la proteína, los ribosomas se adhieren a las membranas del RER y el péptido pasa a través de la bicapa lipídica de éste para quedar contenido en el compartimiento luminal del organoide.

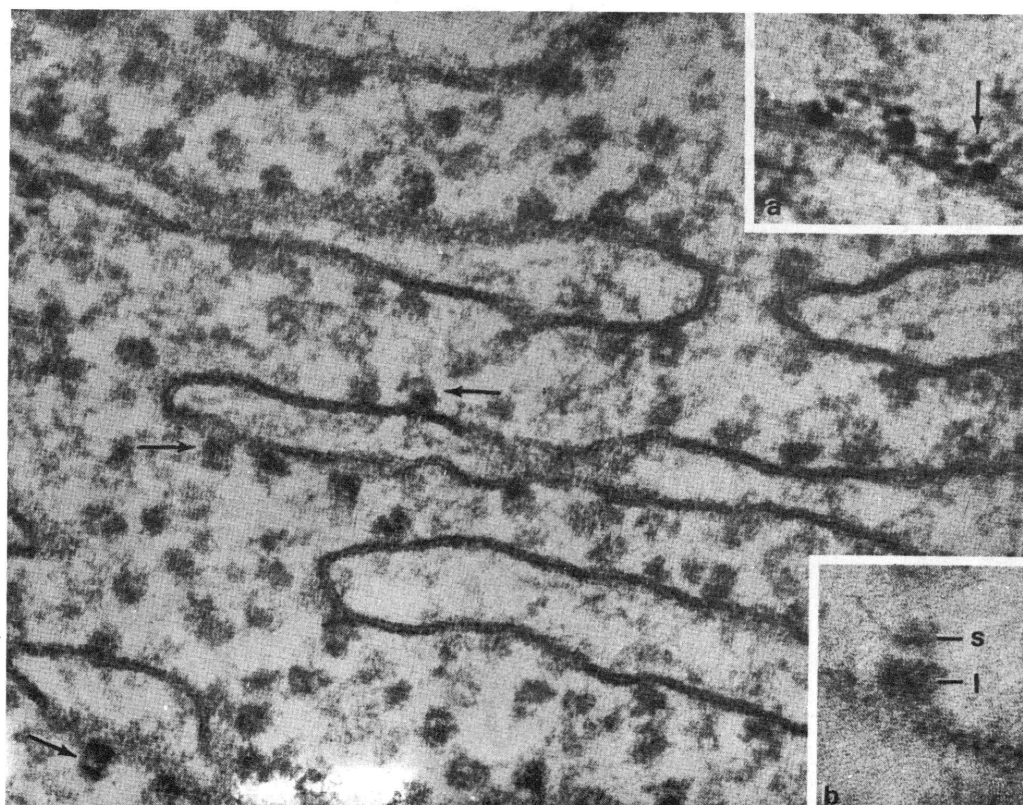


FIG. 8-6. Micrografía electrónica que muestra los ribosomas unidos a las membranas del retículo endoplasmático. Obsérvese la estructura de la unidad de membrana. Las flechas indican ribosomas en los que la unión de la subunidad grande (60 S) a la membrana se aprecia mejor. 208.000×. (Cortesía de G. E. Palade.) **Recuadro a**, unión de las subunidades grande y pequeña (flecha). **Recuadro b**, con mayor aumento las subunidades grande y pequeña aparentan estar separadas por una hendidura clara. a, 200.000×; b, 410.000×. (Cortesía de N. I. Florendo.)

8-5. La marca para las proteínas no citosólicas reside en el polipéptido naciente: el mecanismo de la señal

Se ha comprobado que a medida que la síntesis progresa a partir de los primeros aminoácidos, la cadena polipeptídica va creciendo a través de un "surco" o túnel en la subunidad mayor del ribosoma libre, por el que asoma hacia el citosol. Aquí caben dos caminos posibles:

a) el proceso continúa sin mayores cambios en el ribosoma libre hasta completarse la síntesis de la proteína, que será citosólica;

b) el péptido que va emergiendo del ribosoma es reconocido por una estructura que determina que el conjunto (péptido y ribosoma) sea transferido a las membranas del RER, a las que quedarán adheridos los ribosomas y a través de las cuales será translocado el péptido (fig. 8-7).

Este es el *mecanismo del péptido señal*, cuya secuencia especial de aminoácidos es reconocida por la llamada partícula de reconocimiento de la señal (PRS). Esa secuencia especial, de una longitud variable que oscila alrededor de los 10 aminoácidos, se localiza cerca del extremo N-terminal de la cadena polipeptídica en formación (el que primero asoma del ribosoma), de modo que la información correspondiente —determinada genéticamente— debe estar codificada en el extremo 5' del ARNm. Los aminoácidos de esta secuencia son hi-

drofóbicos, lo que posteriormente favorecerá su inserción a través de la capa bilipídica del RER.

Cuando existe, el péptido señal es reconocido inicialmente por la *partícula de reconocimiento de señal* (PRS), que es un complejo ribonucleoproteico elongado de gran tamaño. Está compuesta por 6 polipéptidos unidos a una molécula de ARN de unos 300 nucleótidos, que pertenece al tipo del *ARN soluble citoplasmático 7S* (ARNsc 7S).

Esta partícula reconoce la señal y se une a ella no bien asoma del ribosoma. Detiene específicamente la síntesis proteica al unirse también al ribosoma e inhibirlo de alguna manera, lo que da tiempo para que los movimientos citosólicos pongan en contacto al complejo péptido-ribosoma-PRS con las membranas del RER.

En este punto se produce la unión específica de la PRS con un *receptor de PRS*, que es una proteína transmembranosa del RER que mantiene unido al complejo hasta que se produzca la unión definitiva de la partícula mayor del ribosoma con otra proteína transmembranosa, el *receptor de ribosoma*. Este mecanismo mantiene adherido el ribosoma a la membrana y produce su orientación correcta, de modo que el péptido naciente queda enfrentado con un complejo proteico membranoso translocador que facilita su entrada a la cavidad del retículo. Luego la PRS se disocia del ribosoma y de su receptor, vuelve al citosol y se reanuda la síntesis proteica. El proceso está ilustrado en la figura 8-8.

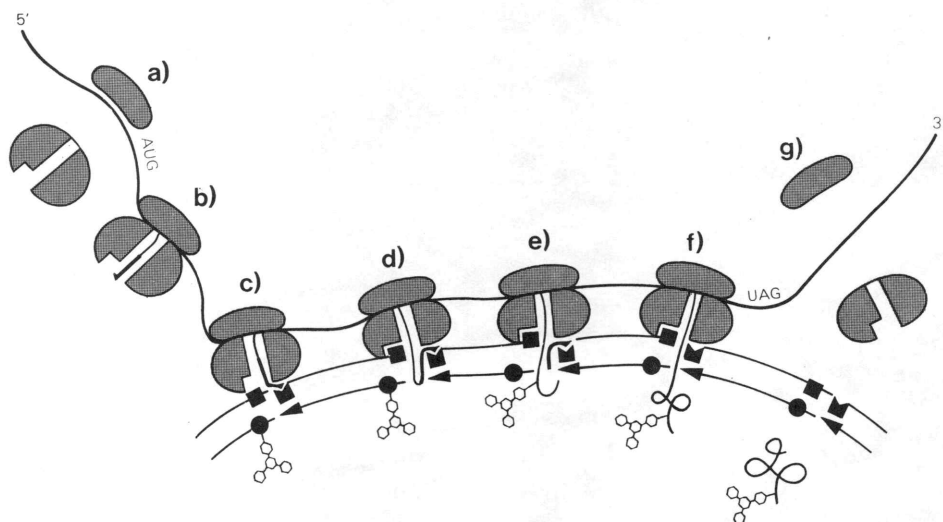


Fig. 8-7. Esquema que indica los principales fenómenos moleculares que tienen lugar durante la síntesis y translocación de un polipéptido a través de la membrana del RE (a). Luego de la iniciación de la traducción el péptido señal (línea más gruesa) emerge de la subunidad ribosómica de 60 S (b) y luego de unirse a la PRS (no representada) el conjunto es llevado a la membrana (c). La asociación del ribosoma con la membrana es reforzada por uniones iónicas y por las riboforinas. La cadena naciente, que en un principio tiene forma de asa, atraviesa la membrana del RE (d). Otras modificaciones cotraduccionales de la cadena en crecimiento son el procesamiento proteolítico por la peptidasa señal (e) en la superficie luminal; la glucosidación en residuos de asparagina a partir de intermediarios dolicol fosfato de oligosacáridos (●■). (f) Una vez terminada la síntesis de proteínas (g), la proteína es segregada en la luz del RER y las subunidades ribosómicas se disocian y se desprenden. (Cortesía de D. D. Sabatini y G. Kreibich.)

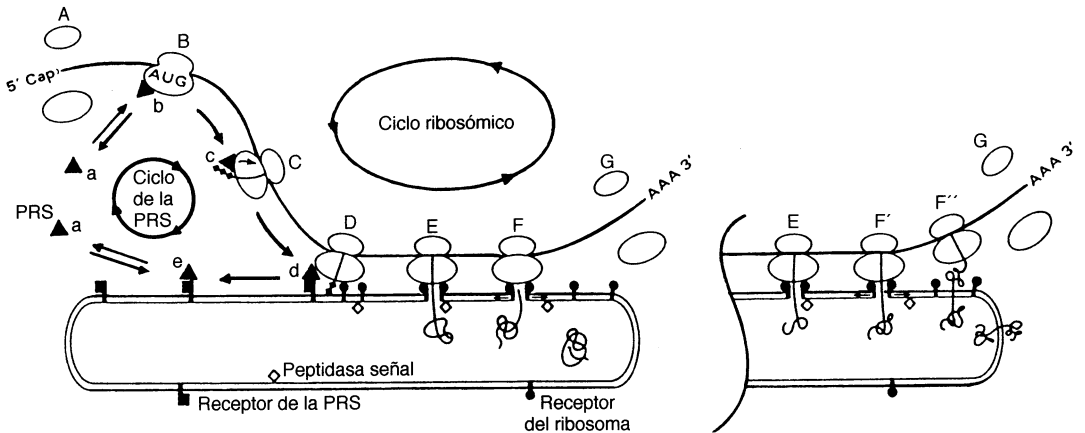


FIG. 8-8. Diagrama que representa el ciclo de la partícula de reconocimiento de la señal (PRS) y cómo ésta se acopla al ciclo ribosómico en la síntesis de una proteína endoluminal (parte izquierda de la figura) o de una proteína de membrana (parte derecha). A-G representan las diversas etapas que transcurren desde que las subunidades del ribosoma libres en el citosol se unen (A) hasta que se separan de la membrana del RE (G). Se indica el ciclo de la PRS (véase la descripción en el texto) y el papel que desempeñan el receptor de la PRS y del ribosoma. En una proteína de membrana las etapas iniciales (A-D) son idénticas, pero las finales son diferentes. (Cortesía de G. Blobel.)

Las secuencias iniciales de las proteínas que no incluyen a los aminoácidos hidrofóbicos característicos de la señal —vale decir, que no tienen péptidos señal— no pueden ser reconocidas por la PRS y continúan sintetizándose en el citosol, hacia donde son liberadas.

8-6. La señal hidrofóbica es separada por una peptidasa señal y el péptido resultante puede seguir siendo modificado

Para que salga del ribosoma y se inserte en la membrana del RER, el péptido nascente debe tener más de 30-40 aminoácidos de longitud. Este continúa creciendo hacia la cavidad del retículo hasta que finaliza la síntesis y es completamente segregado del citosol hacia la luz del organelo.

Es importante recordar que la secuencia hidrofóbica inicial (péptido señal) no está presente en las proteínas definitivas sintetizadas en el RER, salvo raras excepciones como la de la ovoalbúmina. Por lo tanto, en casi todos los casos esta porción de la molécula debe removerse, lo que es efectuado por la *peptidasa señal* asociada al lado luminal de las membranas del RER.

Los polipéptidos que todavía poseen la señal en el interior del RER se denominan *preproteínas*. Además de la pérdida de la señal hidrofóbica, muchas proteínas deben modificar y acortar sus cadenas antes de ser funcionales, como el colágeno, la insulina y otras que son precursores más grandes de las proteínas definitivas. A estos precursores mayores se los denomina *proproteínas*, como el procolágeno o la proinsulina. Haciendo tal vez algo complicada la nomenclatura, a los precursores

proproteicos que todavía mantienen la señal se los denomina *preproproteínas*. Por ejemplo, el ARNm para el colágeno produce primero preprocógeno; éste, después de la extracción del péptido señal, es convertido en procógeno, que más tarde es secretado y clivado nuevamente por las procógeno peptidasas extracelulares para formar la proteína colágeno. Señalemos que, en general, estas proteínas procesadoras pueden pertenecer al RER, al aparato de Golgi, a los gránulos de secreción o, como acabamos de ver, al espacio extracelular.

En la tabla 8-2 se muestra la secuencia señal de una serie de preproteínas y el número de aminoácidos que son extraídos del extremo aminoterminal por la peptidasa señal.

TABLA 8-2. Secuencias señal que se encuentran en las proteínas secretadas

		↓
Preovomucoide	MAMACGVFVLESEVLCGFLPDAAEGAEVD	24
Prelisozima	MRSLLILVLCFLPLAALSKVFX	18
Preproinsulina	MALWMRFLPLALLVLVWEPKPAQAEVQK	24
Prehormona de crecimiento	MAADSQTPWLLTFSLCLLWQEGALPAM	26
Prelactalbúmina	MMSEVSLLLVGILFXATQAEQLT	19
Preopiocortina	MPRLCSSRSGALLALLQASMEVRCWCLE	26
Prepenicilinas	MSIQHERVALIPFEAAECLPVFAHPET	23

La flecha indica el sitio de acción de la peptidasa señal; el número indica la longitud del péptido señal separado por la peptidasa.

Además de la peptidasa señal, en la cara luminal del RER hay enzimas que son capaces de modificar los productos liberados en la cavidad. Como ya vimos, mediante otras peptidasas se deben separar los segmentos adicionales de las proproteínas. En el procesamiento adicional que experimentan muchas proteínas que se forman en el retículo intervienen, entre otras, las *proteínas BiP*. Estas asisten al plegado proteico, que a su vez es estabilizado por la formación de puentes disulfuro por acción de la *disulfuro isomerasa* (PDI). Estos puentes S-S también asocian cadenas peptídicas entre sí como parte de la estructura de las proteínas.

Otras enzimas pueden modificar de diferentes maneras a los polipéptidos nacientes. En el caso particular de la síntesis de colágeno, el precursor proteico debe ser hidroxilado en sus aminoácidos prolina y lisina. Las dos *enzimas hidroxilantes* (prolilhidroxilasa y lisilhidroxilasa) están contenidas en el RER, donde cumplen con su función utilizando α -cetoglutarato, O_2 , ion ferroso y vitamina C como cofactores o sustratos de ambas hidroxilaciones. La base molecular de la enfermedad llamada *escorbuto*, producida por la carencia de vitamina C en la dieta, reside en la producción de colágeno defectuoso por falta de ese cofactor de las hidroxilasas.

8-7. La secreción de proteínas en las bacterias también utiliza un péptido señal

Las proteínas que son secretadas por bacterias siguen un esquema similar al de las células eucarióticas. Aun cuando las bacterias carecen de RE, pueden secretar proteínas destinadas al espacio pe-

riplasmático, a la pared celular o que difunden en el medio (fig. 1-4). Por ejemplo, las bacterias que son resistentes a la penicilina secretan la enzima penicilinasas, y el *Corynebacterium diphtheriae* exporta la toxina diftérica responsable de la enfermedad. La síntesis de estas proteínas y otras (que incluyen a las que van a residir en la membrana bacteriana) es efectuada sobre ribosomas adheridos a la membrana plasmática.

Por la gran concentración de ribosomas, en un corte de una bacteria es imposible detectar con el microscopio electrónico a los ribosomas unidos a la membrana (fig. 1-4). Sin embargo, si se fragmentan las bacterias por sonicación, un porcentaje de los ribosomas se mantiene adherido a la membrana. Esta fracción está enriquecida por el ARN mensajero que codifica a las proteínas que son secretadas por la bacteria. Lo mismo que en el caso de las células eucarióticas, las preproteínas formadas en ribosomas unidos a la membrana son más grandes y contienen un péptido señal hidrofóbico que facilita la translocación a través de la membrana plasmática; éste luego es escindido por una peptidasa señal.

La figura 8-9 ilustra la diferencia, en las bacterias, entre la síntesis de proteínas en polirribosomas libres o unidos a la membrana. Mediante el uso de diferentes marcadores —por ejemplo, drogas que se unen en forma covalente— que no penetran en la bacteria, es posible demostrar que las proteínas que serán secretadas son marcadas mientras los ribosomas todavía se encuentran adheridos a la membrana. Por otro lado, las proteínas formadas en ribosomas libres se mantienen sin marcar.

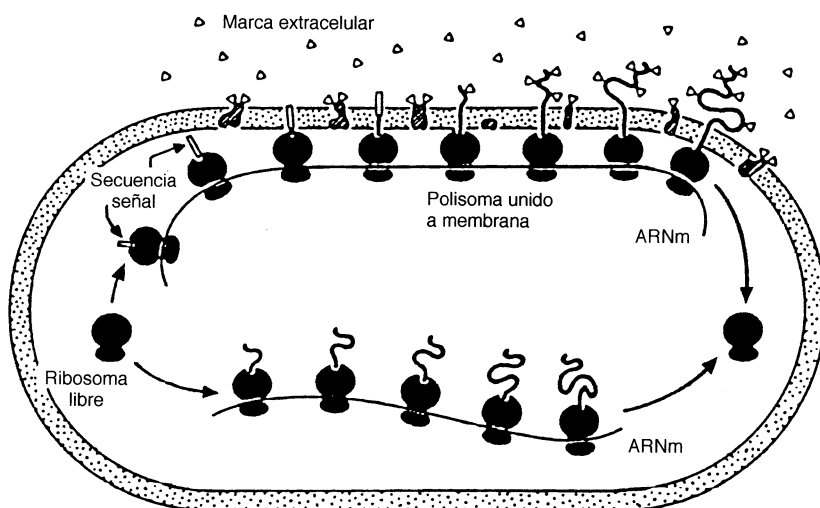


FIG. 8-9. Esquema de la síntesis de proteínas en una bacteria por medio de sus ribosomas libres o unidos a la membrana. Obsérvese que, en este último caso, en la proteína naciente existe una secuencia señal que le permite penetrar en la membrana, luego de lo cual es eliminada y la cadena polipeptídica sintetizada atraviesa la membrana plasmática. El dominio externo puede ser marcado mediante marcadores extracelulares que se unen a los grupos NH_2 o a ciertos aminoácidos.

Las bacterias ofrecen la posibilidad de estudiar mutantes en los cuales se producen cambios en la secuencia de aminoácidos del péptido. Se halló que la sustitución de un simple residuo hidrofóbico puede ser suficiente para suprimir la translocación de la proteína. Como es de esperar, el transporte se vio más afectado cuando se sustituyeron en el péptido señal aminoácidos hidrofóbicos por aminoácidos cargados.

8-8. Las proteínas son sintetizadas en el RER como glucoproteínas

Con algunas excepciones, las proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso son glucoproteínas. Por lo contrario, las proteínas citosólicas prácticamente nunca están glucosiladas, y cuando lo están —como es el caso de algunos factores de transcripción y de las proteínas del complejo de poro nuclear— poseen un componente glucídico muy simple.

A medida que la síntesis proteica progresa, la cadena peptídica va penetrando a través de la membrana del RER. Al detectar una secuencia especial de tres aminoácidos, uno de los cuales es la asparagina, la enzima *oligosacaryltransferasa* le transfiere al péptido, en bloque, un oligosacárido presintetizado de 14 monosacáridos (siempre el mismo), que va a quedar unido al grupo $-NH_2$ de la asparagina. Por eso es que al oligosacárido se lo denomina *N-unido* o *asparagina-unido* —veremos más adelante que unas pocas glucoproteínas poseen oligosacáridos *O-unidos*, originados de otra manera—.

El oligosacárido preformado había sido sintetizado en la membrana del RER por un mecanismo complejo, y hasta ese momento permanecía unido a un lípido especial de la membrana, el *dolicol fosfato*, que es un largo poliisoprenol.

De sus 14 monosacáridos, el oligosacárido inicialmente transferido posee 2 moléculas de N-acetilglucosamina, 9 de manosa y 3 de glucosa.

Esta composición no se conserva en las glucoproteínas definitivas, y el oligosacárido inicial es rápidamente modificado cuando todavía se encuentra en el RER, ya que las tres glucosas y por lo menos una de las manosas son removidas en casi todos los casos. La estructura remanente del oligosacárido es extensamente modificada en el aparato de Golgi, de acuerdo con la proteína de que se trate, en etapas ulteriores de la maduración glucoproteica. Pese a esto cabe destacar que, del precursor común de 14 monosacáridos, en la mayor parte de las glucoproteínas definitivas se conserva la secuencia de las dos N-acetilglucosaminas y tres de las manosas. Esto constituye el llamado “núcleo” del oligosacárido.

8-9. Dirección y segregación de proteínas

Anteriormente vimos que en una célula se podrían sintetizar aproximadamente diez mil proteínas diferentes, sea en ribosomas libres en el citosol o en ribosomas adheridos a la membrana del RER. El destino final de estas proteínas puede ser:

- 1) la secreción hacia el exterior de la célula;
- 2) la incorporación al interior de diversos compartimientos intracelulares;
- 3) la integración a las membranas.

Por ejemplo, las histonas y otras proteínas nucleares deben cruzar la envoltura nuclear para llegar al nucleoplasma; las enzimas del ciclo de Krebs deben atravesar las dos membranas de la mitocondria para entrar en su cámara interna; las proteínas peroxisómicas deben penetrar en ese organoide pasando a través de su membrana. Por otro lado, algunas de las enzimas de la cadena respiratoria de las mitocondrias, o los complejos del fotosistema de los cloroplastos, se integran en las membranas internas del organoide. De manera muy elemental, la figura 8-10 ilustra estos diferentes tipos de segregación de proteínas.

La comprensión del mecanismo que interviene en la dirección y segregación de las proteínas requiere la identificación de todos los pasos mediante los cuales un polipéptido es transferido desde el sitio de síntesis hasta aquel donde cumplirá su función. Deben intervenir mecanismos especiales para seleccionar las diversas subpoblaciones de proteínas.

Como mecanismo general se acepta que la información para el tránsito selectivo de proteínas reside en ciertas secuencias de la cadena polipeptídica (señales) que son interpretadas por diferentes estructuras celulares como marcas para la guía y la translocación proteicas.

Se pueden comparar estas secuencias con el código postal de una carta, mediante el cual ésta llega a destino. Puesto que el número de códigos es relativamente pequeño en comparación con el número de proteínas, podemos concebir que cada subpoblación comparte un tipo similar de secuencia.

En la sección anterior estudiamos el caso de las proteínas no citosólicas que tienen la secuencia de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo N-terminal denominada “péptido señal”. Existe también una multitud de señales equivalentes en diferentes partes de las proteínas sintetizadas, que son interpretadas de modo específico. Por ejemplo, una secuencia especial de cuatro aminoácidos hidrofóbicos en el extremo C-terminal es la señal para que la proteína sea retenida en el RER, y la secuencia serina-lisina-leucina es la señal para que sea introducida en los peroxisomas. En ocasiones, como en las glucoproteínas destinadas al interior de los lisosomas, la señal reside en el oligosacárido.

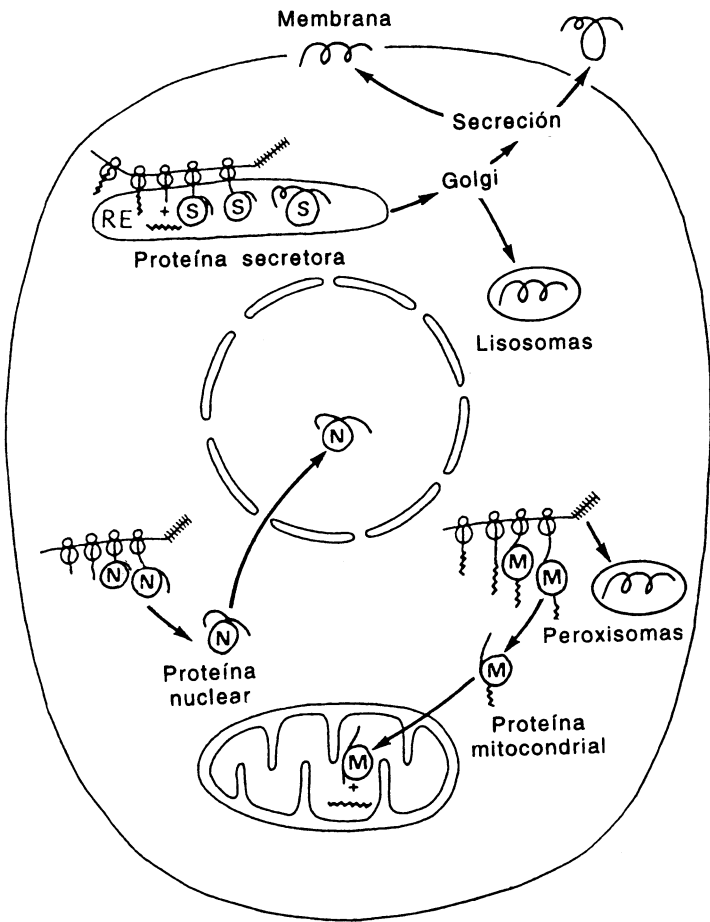


FIG. 8-10. Esquema que muestra diferentes vías que siguen las proteínas sintetizadas para llegar a su destino final.

8-10. Translocación cotraduccional y postraduccional de las proteínas. Secuencias de segregación

Existen dos mecanismos diferentes por medio de los cuales las proteínas pueden ser guiadas o translocadas hacia su destino: *translocación cotraduccional* y *postraduccional* (fig. 8-10).

En el primer caso, ejemplificado por las proteínas secretoras, la translocación está acoplada con la traducción —es decir, se produce simultáneamente con la síntesis proteica—. En el segundo caso, ejemplificado por algunas de las proteínas de las matrices mitocondrial o cloroplástica, las proteínas son translocadas después de haber sido sintetizadas por completo en ribosomas libres en el citosol. Para llegar a su destino estas proteínas deben ser translocadas a través de las membranas de estos orgánulos. En ambos tipos de translocación, además de una secuencia especial en el polipéptido, debe existir un receptor o translocador en la membrana para reconocer la señal correspondiente.

Las proteínas que van hacia el núcleo se acumulan muy selectivamente en él después de haber

completado su síntesis en el citosol. Aquí, la propiedad de segregación reside al parecer en las propiedades de los complejos de poro de la carioteca de reconocer una secuencia especial de unos ocho aminoácidos.

Podemos concluir que la segregación de proteínas se logra mediante varios mecanismos que difieren en sus secuencias de transferencia y probablemente en el receptor. Esto no llama la atención, en vista de la complejidad estructural y funcional de la célula viviente.

8-11. Síntesis y ensamble de las proteínas de membrana. Secuencias de detención de la transferencia

Para estudiar cómo se sintetizan e insertan las proteínas de la membrana plasmática, el estudiante debe recordar el modelo fluido analizado en el capítulo 4. Como se ilustra en la figura 4-3, las proteínas pueden quedar expuestas hacia el lado citoplasmático (endoproteínas) o hacia el lado extracitoplasmático (ectoproteínas). Además, existe una clase importante de proteínas que atraviesan

la membrana y quedan expuestas a ambos lados. ¿Cuáles podrían ser los mecanismos de síntesis de estos diferentes tipos de proteínas?

Las endoproteínas (periféricas e integrales) podrían ser sintetizadas sobre ribosomas libres o adheridos, localizados en el mismo compartimiento celular. Por ejemplo, en eritroblastos, que no contienen RE, todas las proteínas de la cara citoplasmática son producidas por ribosomas libres.

En otras células las ectoproteínas parecen ser sintetizadas exclusivamente sobre ribosomas adheridos a las membranas del RER, y luego son transferidas hacia la luz. Algunas de estas proteínas pueden ser secretadas, pero otras quedan como residentes permanentes en las cavidades del RER o del REL. Tal es el caso de la calsecuestrina, proteína fijadora de calcio que se encuentra en el interior del retículo endoplasmático del músculo.

Un caso muy especial es el de las proteínas transmembranas. Aquí la síntesis también se efectúa sobre ribosomas unidos a la membrana, pero la inserción se debe a una transferencia vectorial incompleta de la cadena polipeptídica. En este caso existe un segmento hidrofóbico equivalente al péptido señal, pero éste va seguido por otra secuencia hidrofóbica que actúa como señal de detención de la transferencia. En todos los casos estudiados hasta ahora, estas secuencias de detención de la transferencia parecen estar formadas por 11 a 24 aminoácidos básicos, que pueden ayudar a fijar la proteína a la membrana (fig. 8-11).

La figura 8-12 resume los diversos mecanismos mediante los cuales los ribosomas fijos pueden dar origen a proteínas que residen en la luz o que son incorporadas en la membrana como proteínas periféricas, integrales o transmembranas.

Obsérvese que en el último tipo existe una orientación especial de la proteína, con el extremo $-NH_2$ frente a la luz y el terminal $-COOH$ en la cara citoplasmática.

8-12. El retículo endoplasmático liso (REL) es un organoide multifuncional

Los estudios iniciales sobre el retículo endoplasmático se concentraron en la variedad rugosa o granular (RER). Pronto se hizo evidente que en el endoplasma celular existe otro sistema membranoso, sin ribosomas y con una estructura diferente, que no está constituido por cisternas aplanadas más o menos paralelas como las del RER, sino por un sistema laberíntico de túbulos irregulares, ramificados y anastomosados, que se denominó *retículo endoplasmático liso* (REL). El grado de desarrollo de este organoide es muy variable, y en algunos tipos celulares especializados puede superar al del RER.

El hecho de que estas membranas carecieran de ribosomas hizo pensar que su función no estaría directamente relacionada con la síntesis de proteínas. Al mismo tiempo, el notable desarrollo del REL en células adiposas y sebáceas sugirió una posible relación con el metabolismo lipídico; su presencia constante en grandes cantidades en el citoplasma de células endocrinas sintetizadoras de esteroides —como las del ovario, la suprarrenal y el testículo— se relacionó con la síntesis de estos compuestos; la observación del incremento del REL en hepatocitos en los que se indujo el desarrollo del sistema oxidásico de función mixta sugirió que estas enzimas residirían en sus membranas; también la distribución ordenada y característica del retículo sarcoplasmático —una variedad del REL en el músculo estriado— llevó a especular que de alguna manera estaría relacionado con los mecanismos de contracción muscular.

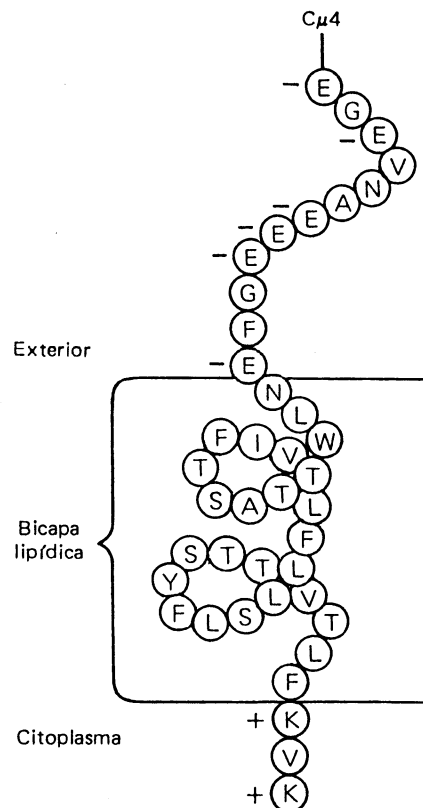


FIG. 8-11. Esquema de una proteína transmembrana (inmunoglobulina de un linfocito). En este caso la cadena μ tiene una secuencia de 26 residuos hidrofóbicos sin carga que se extienden a través de la membrana y van seguidos del lado citoplasmático por Lys-Val-Lys (K-V-K). También se ilustra que el dominio intramembranoso de la cadena está flanqueado por aminoácidos con carga positiva y negativa.

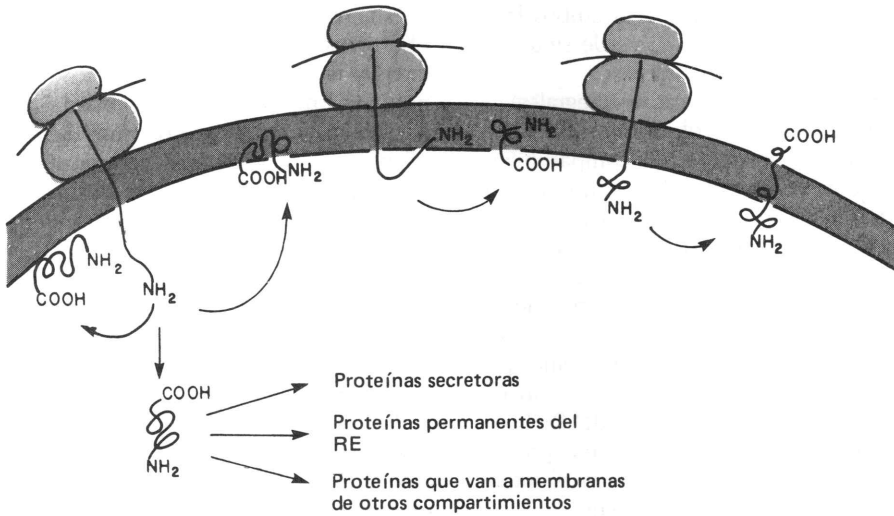


FIG. 8-12. Esquema de los posibles mecanismos por los cuales los ribosomas unidos al RER pueden dar lugar a proteínas que se depositan en la luz del RE o que se incorporan como proteínas periféricas o intrínsecas en el lado luminal o como proteína transmembranosa. (Cortesía de D. D. Sabatini y G. Kreibich [1976].)

Estas y otras observaciones morfológicas realizadas en tipos celulares diversos en los que el REL parecía estar asociado a una cantidad de funciones diferentes condujeron a postular la existencia del retículo endoplasmático liso como una entidad definida e independiente del retículo rugoso. Sin embargo, ambas estructuras tienen muchos elementos en común, y habitualmente se considera la existencia de un retículo endoplasmático con dos variantes o especializaciones —rugosa y lisa—, que frecuentemente se interconectan para formar un sistema continuo.

8-13. Desde el punto de vista bioquímico, las técnicas de fraccionamiento celular permiten aislar y analizar los componentes de ambos retículos

En el capítulo 3 se introdujeron las técnicas de fraccionamiento celular (fig. 3-23) y el concepto de *fracción microsómica* o *microsomas* que pueden ser aislados después de la separación de las fracciones nuclear y mitocondrial. Los estudios de microscopía electrónica demostraron que esta fracción es bastante compleja, ya que además de contener membranas de ambos retículos (RER y REL) los microsomas incluyen fragmentos de membrana plasmática y partes del complejo de Golgi. Durante la homogeneización de la célula las membranas se rompen, pero inmediatamente se resellan y mantienen intactas las relaciones topográficas entre las membranas, la luz y los ribosomas.

El estudiante debe recordar que “microsomas” es un término que se aplica exclusivamente al re-

sultado de una técnica de fraccionamiento que fragmenta y permite aislar y estudiar bioquímicamente componentes membranosos del citoplasma, pero que en la célula viva no hay ninguna estructura denominada así.

Los microsomas son, como vimos, una fracción heterogénea, pero que puede a su vez ser subfraccionada. Como consecuencia de su diferente densidad pueden separarse los *microsomas rugosos* de los *microsomas lisos*.

También es posible subfraccionar a los microsomas rugosos en sus dos componentes principales. Así, las membranas pueden ser liberadas de los ribosomas mediante soluciones de alto contenido salino y por tratamiento con puromicina, que detiene el crecimiento de la cadena polipeptídica. Los ribosomas también pueden separarse con desoxicolato, un agente tensioactivo que solubiliza la membrana.

Es posible extraer, por último, el contenido de la luz microsómica, que comprende principalmente a los precursores de las proteínas sintetizadas en el RER (albúmina y otras proteínas séricas en el caso del hígado). Esto se consigue mediante ultrasonificación en concentraciones muy bajas de detergente, que al abrir orificios en la membrana permite la salida del contenido luminal.

Pese a que los microsomas rugosos son considerados verdaderamente representativos del RER intacto, la heterogeneidad de la fracción microsómica lisa dificulta la interpretación de los estudios bioquímicos de ésta en cuanto a su equivalencia con las propiedades enzimáticas y funcionales del REL de la célula viva.

8-14. El retículo endoplasmático liso tiene funciones de síntesis de lípidos y esteroides, detoxificación, movilización de glucosa y almacenamiento de calcio

Además de ciertas funciones generales que se aplican a ambas porciones del RE (véase más adelante), la parte lisa (REL) tiene otras que prevalecen. En la tabla 8-3 se indican algunas de las actividades enzimáticas de los microsomas lisos. Sorprendentemente, ningún sistema enzimático estudiado es exclusivo de la porción lisa, aunque cuantitativamente el REL es el que desempeña la mayor parte de cada una de las funciones que analizaremos a continuación:

1. Síntesis de lípidos. Las enzimas para la biosíntesis de fosfolípidos de membrana están circunscriptas en gran medida en el REL. Dado que los precursores de estas moléculas son citosólicos—colina, ácidos grasos y glicerol fosfato para la fosfatidilcolina, que es la que se produce en mayor cantidad—, los fosfolípidos recién sintetizados quedan insertados en la mitad citosólica de la bicapa. Como vimos en el capítulo 4, los movimientos de translocación de moléculas de una a otra mitad de la bicapa son extremadamente dificultosos. Por ello, pasa asegurar la distribución adecuada de los componentes sintetizados en ambas hojas de las membranas, el REL contiene *translocadores fosfolipídicos* ("flipasas") que mueven esas moléculas de la cara citosólica a la luminal.

Los estudios con precursores radiactivos mostraron que los fosfolípidos recién sintetizados pueden ser transferidos rápidamente a otras membranas celulares. No se conoce bien el mecanismo de esta transferencia, pero podría deberse a la intervención de proteínas de intercambio de fosfolípidos, que se encuentran en el citosol y a menudo son específicas para una clase de fosfolípido.

El REL contiene también muchas de las enzimas utilizadas en la *biosíntesis de triglicéridos*, y el organoide está bien desarrollado en adipocitos blancos y en los de la grasa parda. En la fase de absorción intestinal de los lípidos, éstos son emulsionados por las sales biliares y parcialmente hidrolizados por las lipasas digestivas. Los productos resultantes (principalmente monoglicéridos y ácidos grasos) difunden a través de la membrana de la chapa estriada de los enterocitos (cap. 6-1), y en el citoplasma apical de estas células son captados por el REL, que reconstituye los triglicéridos.

2. Síntesis de esteroides. Como vimos anteriormente, el REL es el organoide más prominente en todas las células de las glándulas endocrinas esteroideogénicas. Los estudios bioquímicos sobre fracciones microsómicas lisas demostraron que las enzimas que intervienen en la síntesis de *colesterol* a

partir de acetato residen en sus membranas. Curiosamente, las enzimas necesarias para la remoción de la cadena lateral del colesterol para convertirlo en *pregnenolona*—el precursor común de todas las hormonas esteroides— existe únicamente en las mitocondrias, que toman al colesterol y lo devuelven como pregnenolona a las membranas del REL, donde se completa la vía biosintética de *andrógenos*, *estrógenos*, *progesterona* o *corticoides suprarrenales*, según el órgano considerado.

3. Detoxificación. Los mecanismos de inactivación de drogas o de moléculas generadas por el propio organismo son múltiples y complejos, y exceden los límites de un texto de biología celular. Nos limitaremos entonces a exponer los hechos más importantes de este proceso, en particular los referidos a su relación con el retículo endoplasmático liso.

El principio general de la inactivación consiste en transformar a las drogas liposolubles—que tienden a penetrar en las células e integrarse a sus membranas— en compuestos ionizables altamente hidrosolubles, pasibles de ser eliminados rápidamente del organismo por diversas vías, principalmente con la orina.

Esto se cumple en general en dos etapas sucesivas: en la fase I se oxida a la droga—lo que por sí mismo incrementa su solubilidad— y en la fase II se une la droga oxidada con otra molécula, de lo que resulta un conjugado ionizado aún más soluble y excretable.

TABLA 8-3. Algunas actividades enzimáticas de los microsomas (modificado de Rothschild)

Síntesis de glicéridos
Triglicéridos
Fosfátidos
Glucolípidos y plasmalógenos
Metabolismo de plasmalógenos
Biosíntesis de esteroides
Biosíntesis de colesterol
Hidrogenación de esteroides con uniones no saturadas
Transformación de esteroides que requieren $\text{NADPH}_2 + \text{O}_2$
Aromatización
Hidroxilación
Detoxificación de drogas que requieren $\text{NADPH}_2 + \text{O}_2$
Hidroxilaciones aromáticas
Oxidaciones de cadenas laterales
Desaminación
Oxidación de radicales tioésteres
Desulfuración
Síntesis de ácido L-ascórbico
Metabolismo del ácido UDP-urónico
Desfosforilación de UDP-glucosa
Arilsulfatasa y sulfatasa esteroide

Las oxidaciones características de la fase I son consideradas las más importantes en los procesos de destoxificación. Las enzimas involucradas componen el llamado *sistema oxidativo de función mixta*, que reside principalmente en las membranas del retículo endoplasmático liso, en particular del hígado, aunque el RER presenta también alguna actividad.

Este sistema comprende dos *cadena de transporte de electrones*, unidas a la membrana por medio de una cola hidrofóbica que penetra en la bicapa lipídica. Cada cadena posee una de dos *flavoproteínas* (citocromo c reductasa o citocromo b_5 reductasa) y una de dos *hemoproteínas* (citocromo P_{450} o b_5).

La principal cadena es la de *citocromo P_{450} y citocromo c reductasa*. La citocromo c reductasa cataliza la transferencia de electrones de la NADPH (que es indispensable) al citocromo P_{450} , que es el aceptor terminal de electrones y provee el *sitio de unión a las drogas*. En realidad, P_{450} es el término genérico utilizado para designar a una familia de péptidos que abarca casi veinte miembros diferentes, cada uno de ellos con un amplio rango de especificidad para distintos tipos de drogas.

La cadena de *citocromo b_5 y citocromo b_5 reductasa* no utiliza electrones provenientes del NADPH sino del NADH.

Una característica de las oxidasa de función mixta es la de intervenir en reacciones oxidativas de muy variados tipos, como hidroxilaciones de anillos aromáticos —por ejemplo, el benzol es transformado en fenol— o de cadenas laterales —como en los barbitúricos—; la desmetilación —así es como el antitúxico codeína (o metilmorfina) se transforma en morfina en el organismo—; la desaminación —como la que en el REL transforma a la anfetamina en fenilacetona—; etcétera.

Como ya vimos, a consecuencia de estas diferentes reacciones las drogas oxidadas se tornan constantemente más hidrosolubles. A pesar de lo que sería deseable, la actividad biológica de la droga original puede no verse afectada en sí misma; lo que es más grave, en ocasiones la molécula oxidada es decididamente más peligrosa que la original. Considérense por ejemplo los casos de la desmetilación de la codeína recién mencionada, que genera morfina, o del benzopireno —que se encuentra en la carne muy asada al carbón—, que es relativamente inofensivo, pero que luego de su transformación en el hígado se convierte en 5,6-epóxido, un poderoso cancerígeno (induce cáncer). Por ello, a pesar de que en la mayor parte de los casos el término “destoxificación” se puede aplicar sin reparos a esta función del REL hepático, convendría hablar en general de *transformación* de drogas.

Un hecho importante es que si se administran ciertas drogas hidrofóbicas que se transforman por este sistema, como los barbitúricos o el 3-metilcolantreno, se induce un notable aumento de las enzimas relacionadas con su destoxificación a la vez que una hipertrofia considerable del retículo endoplasmático liso donde residen. Se dice por ello que el sistema es *inducible*, y esta inducción es responsable de algunas tolerancias farmacológicas, a veces cruzadas.

La fase II del sistema de metabolismo de drogas consiste en la unión de éstas, muchas veces ya oxidadas por el sistema de oxidasa de función mixta que acabamos de analizar, con diversas moléculas hidrofílicas que en general inactivan a la droga además de formar con ella compuestos conjugados, ionizados y muy solubles, que por lo tanto son fácilmente excretados del organismo.

Las enzimas más importantes involucradas en la fase II son las *transferasas*. Al igual que las oxidasa de función mixta, residen en las membranas del REL de los hepatocitos principalmente; también son inducibles. Existen dos familias principales de transferasas: las *glucuroniltransferasas*, que transfieren UDP-glucuronato a una amplia serie de sustratos, y las *sulfotransferasas*, que transfieren grupos sulfato ($-\text{SO}_4^{2-}$). Por ejemplo, la bilirrubina libre generada por el propio metabolismo (que es hidrofóbica, neurotóxica y no excretable) es conjugada con ácido glucurónico en el REL del hígado para formar la llamada bilirrubina indirecta (no tóxica y excretable con la bilis y la orina).

En general el sistema desintoxicante del REL del hígado es activo en el recién nacido, pero su capacidad completa se alcanza sólo después de varios meses. Por ello no es raro observar la llamada *hiperbilirrubinemia neonatal*, que inicialmente cursa como una pigmentación amarilla característica de la piel y mucosas, producida por acumulación de bilirrubina libre debido a un relativo subdesarrollo del REL. En estos casos la solución es simple, e ilustra sobre las ventajas de convertir a los compuestos hidrofóbicos en hidrofílicos con el propósito de eliminarlos del organismo: se expone al niño a la acción de una luz intensa —como la de los tubos fluorescentes comunes—. Esto transforma a la bilirrubina libre, hidrofóbica y tóxica, en un fotosólido soluble que es eliminado con la orina.

4. **Movilización de glucosa.** Cuando existe necesidad de glucosa en el organismo entre las comidas o durante el ejercicio muscular, las reservas hepáticas de este monosacárido almacenadas como inclusiones de *glucógeno* son movilizadas hacia la sangre. Como vimos en el capítulo 5, esta movilización comprende varios pasos sucesivos que analizaremos a continuación, uno de los cuales tiene lugar en el REL de los hepatocitos.

a) El glucógeno es escindido secuencialmente por el ortofosfato para producir *glucosa 1-fosfato* (G1P) por acción de la enzima *glucógeno fosforilasa* junto con otras como la enzima *desramificante*, cofactores y reguladores. Este proceso, denomina-

do *glucogenólisis*, ocurre en todas las células y es independiente del retículo endoplasmático, ya que esas enzimas pertenecen al citosol —en realidad se asocian a la periferia de los gránulos de glucógeno para formar los glucosomas— (fig. 8-13).

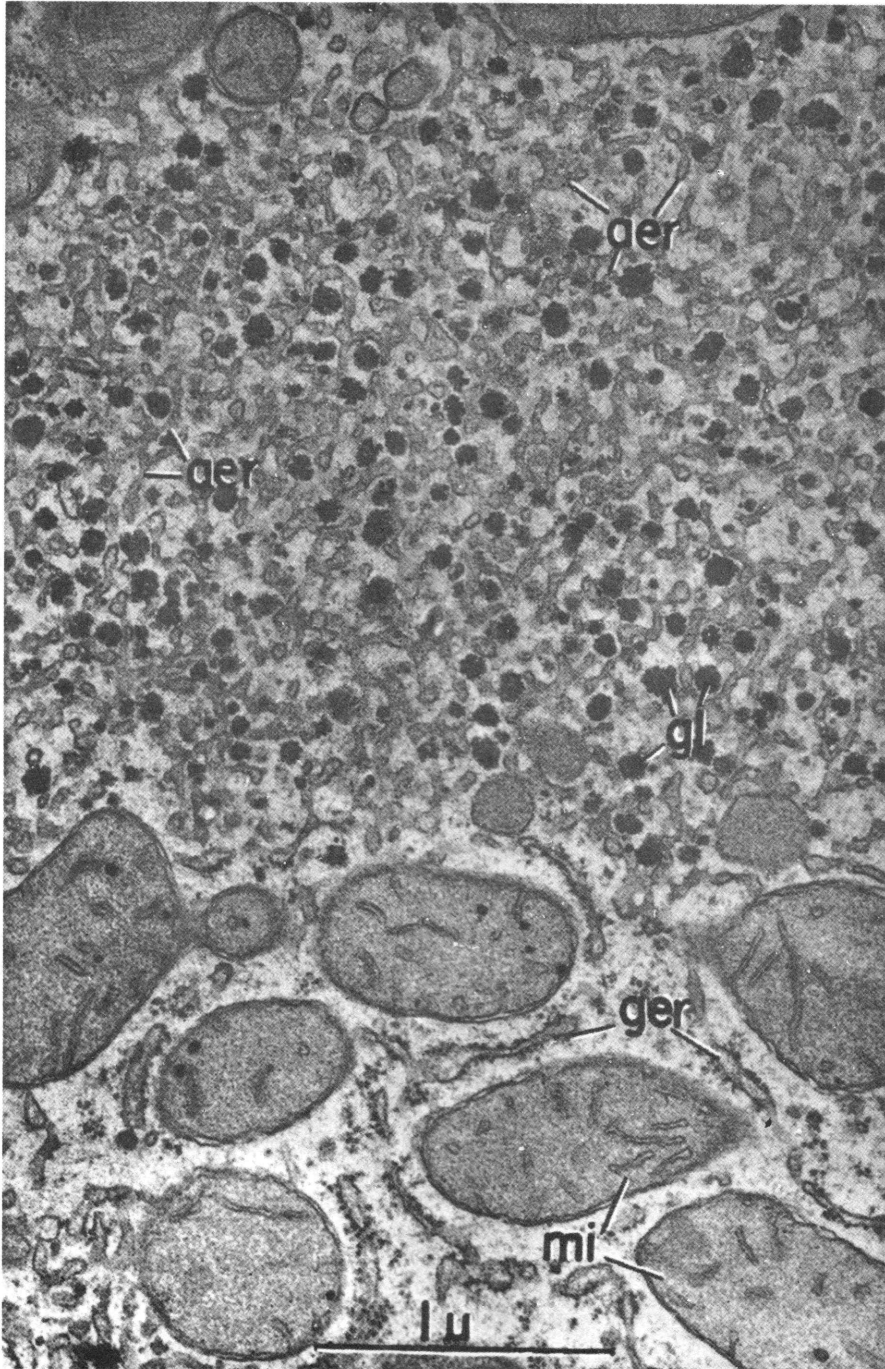


FIG. 8-13. Micrografía electrónica del citoplasma de una célula hepática. En la parte inferior se observan el retículo endoplasmático granular (ger) y las mitocondrias (mi); en la parte superior, el citosol vecino al retículo endoplasmático liso (aer) contiene numerosos gránulos de glucógeno (gl). 45.000X. (Cortesía de G. E. Palade.)

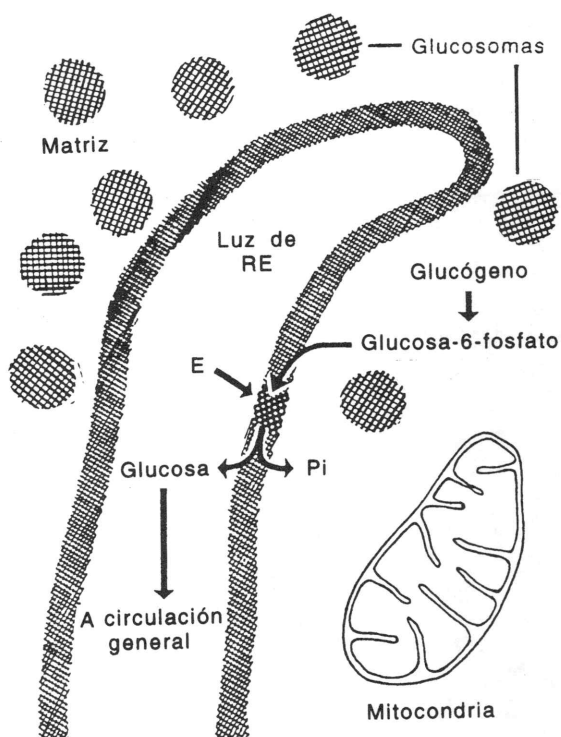


FIG. 8-14. Esquema que ilustra la participación del retículo endoplasmático liso en la movilización de la glucosa a partir de la glucosa 6-fosfato generada por la glucogenólisis citosólica. La enzima glucosa 6-fosfatasa (E) se encuentra en la membrana, donde adopta una disposición vectorial que le permite recibir a la G6P por la superficie citosólica. El producto —glucosa libre— penetra en la luz del REL.

b) El segundo paso en la movilización de la glucosa es su *desfosforilación*. En todas las células (salvo en los hepatocitos), una de las ventajas de que la glucosa obtenida esté fosforilada es que esta molécula ionizada no puede difundir a través de la membrana plasmática, de modo que permanece en el citosol hasta que la *fosfoglucomutasa* la transforma en *glucosa 6-fosfato* (G6P), que a su vez es isomerizada para ser metabolizada en la vía de la glucólisis anaerobia. En el caso de la movilización de las reservas del hígado, donde la glucosa no debe ser metabolizada sino que debe salir hacia el espacio extracelular y la sangre, la G6P es convertida en glucosa libre.

El proceso de desfosforilación de la glucosa tiene lugar en el REL, y casi exclusivamente en el del hepatocito. La enzima responsable es la *glucosa 6-fosfatasa* (G6Pasa), una proteína integral de la membrana del retículo; está ausente en otras células que almacenan glucógeno, como las musculares, por lo cual éstas utilizan la G6P en su propio metabolismo. La G6Pasa adopta una disposición vectorial en las membranas que le permite recibir a la G6P por la superficie citosólica del REL y trans-

ferir la glucosa libre hacia la luz del retículo, mientras que el Pi queda libre en el citosol (fig. 8-14).

c) El tercer paso consiste en la circulación de la glucosa libre por el interior del retículo hasta su salida de éste en las proximidades de la superficie celular; en la membrana plasmática la glucosa es tomada por las permeasas específicas, que por difusión facilitada (a favor de gradiente) la translocan hacia el espacio de Disse.

5. **Almacenamiento y liberación de calcio.** En el capítulo 7 analizamos el importante papel del calcio como segundo mensajero de la señalización intercelular. Dijimos que la baja concentración citosólica de este catión se logra mediante los mecanismos combinados de extracción activa a través de la membrana celular y su secuestro hacia el interior del sistema de endomembranas; en condiciones extremas también se acumula en las mitocondrias.

En casi todos los tipos celulares la acumulación endomembranosa se produce por transporte activo mediante una ATPasa Ca^{2+} -dependiente hacia pequeños elementos tubulares o más comúnmente vesiculares, a veces denominados *calciosomas*, que se consideran componentes del REL e integrantes del llamado *compartimiento secuestrador de calcio*. En sus membranas existen canales iónicos de calcio, regulados principalmente por el IP_3 , cuya apertura posibilita el aumento transitorio de la concentración citosólica del catión.

Este sistema membranoso especializado alcanza su máximo grado de desarrollo en el músculo estriado. Con el nombre de *retículo sarcoplasmático* (fig. 5-43), esta versión muscular de retículo endoplasmático liso fue analizada en el capítulo 5.

8-15. La biogénesis de la membrana implica un mecanismo múltiple

Una característica general de la biogénesis de las membranas es que ninguna de ellas puede formarse *de novo*. En todos los casos crecen como una expansión de membranas preexistentes, en las que se van insertando los lípidos y proteínas que distinguen a cada tipo de membrana.

Ciertos organoides poseen membranas de características tales que la génesis de éstas debe hacerse obligatoriamente a partir de membranas del mismo tipo. Las mitocondrias, los cloroplastos o los peroxisomas, por ejemplo, se originan por crecimiento y división de otros preexistentes. Para su crecimiento, sin embargo, se importan lípidos y proteínas sintetizados fuera de ellos.

En el caso de otros organoides, como el retículo endoplasmático rugoso, el liso y la carioteca, existe cierto aporte de una estructura a otra. Algunas observaciones con el microscopio electrónico de células en vías de diferenciación sugieren que el RER

puede desarrollarse a partir de la envoltura nuclear (fig. 5-1). Los estudios citoquímicos también sugieren una identidad entre estas dos porciones del sistema vacuolar.

La relación entre el REL y el RER también puede estudiarse en las células en diferenciación. Poco antes del nacimiento se observa en el hígado de la rata un aumento preferente del tipo rugoso, mientras que después del nacimiento el tipo liso es el que revela un crecimiento mayor. Los estudios experimentales que emplean precursores de las proteínas (como la leucina- ^{14}C) y de los lípidos (como el glicerol- ^{14}C) demostraron que durante el período de crecimiento rápido del RE, la incorporación de proteínas y lípidos es mayor en el tipo rugoso que en el liso. Este hallazgo sugiere que la síntesis de membrana sigue la dirección RE rugoso→liso.

Además de la continuidad estructural y funcional, también existe una continuidad temporal entre los distintos compartimientos membranosos del sistema vacuolar. Esto hace referencia al hecho de que cada célula recibe de su progenitora un juego completo de membranas.

En la actualidad se piensa que la biogénesis de las membranas ocurre por un mecanismo múltiple, que comprende primero la síntesis de los lípidos básicos de la membrana y de las proteínas intrínsecas, seguida del agregado en secuencia de otros componentes, como enzimas, azúcares y lípidos específicos. Este proceso por el cual la membrana se modifica en su estructura y composición puede considerarse una diferenciación.

Las evidencias existentes sugieren que los lípidos y las proteínas podrían agregarse a las diversas membranas celulares independientemente unos de otros. En otras palabras, el crecimiento de la membrana es el resultado de la inserción de las moléculas individuales de lípido o proteína. Como ya vimos, el REL es el organoide que contiene las enzimas principales que sintetizan a los fosfolípidos. Al contrario de la membrana plasmática, donde el movimiento a través de la bicapa de fosfolípidos es muy lento, aquí se produce una rápida distribución de los fosfolípidos entre las dos monocapas —es decir, hay un intenso movimiento de translocación entre las dos mitades de la bicapa—.

La inserción de proteínas en la membrana del RE es independiente de la de los lípidos. La mayoría de las proteínas se forma sobre ribosomas unidos a la membrana; empero, algunas proteínas del RE son formadas por ribosomas libres en el citosol para ser luego insertadas en la membrana. Este es el caso de la NADH citocromo b_5 reductasa, que después de ser sintetizada en el citosol se incorpora a diversas partes del sistema de endomembranas —es decir, el RE rugoso y liso, el complejo de Golgi— y también a la membrana mitocondrial externa.

8-16. Las membranas del retículo endoplasmático fluyen a través del citoplasma

El RE puede funcionar como una especie de sistema circulatorio para el transporte intracelular de diversas sustancias. El flujo de membranas constituye un importante mecanismo para el desplazamiento de moléculas, iones o partículas hacia el interior o el exterior de las células. Las continuidades que se observan en algunos casos entre el RE y la envoltura nuclear sugieren que también en este punto existe flujo de membranas.

Podemos considerar que la membrana del RE es muy dinámica y fluida a la temperatura del cuerpo. La criofractura ha demostrado que los ribosomas unidos al RE son móviles y que este movimiento depende de la fluidez de la membrana. El concepto de flujo se refiere no sólo al contenido del RE, sino también a la membrana. Varios estudios sugieren que la transferencia de proteínas secretorias es acompañada por el flujo de proteínas de membrana que se sintetizan e incorporan al RE rugoso.

8-17. Los iones y pequeñas moléculas son transportados a través de la membrana del retículo endoplasmático

La enorme superficie interna proporcionada por el RE da una idea de la importancia de los intercambios que ocurren entre la matriz y el compartimiento interno. Se sabe que el sistema endomembranoso de la célula posee propiedades osmóticas y que también los microsomas, después de su aislamiento, se expanden o se contraen según la presión osmótica del medio. El transporte a través de las membranas puede ser de tipo pasivo o activo, y al igual que en la membrana plasmática, se ha sostenido que aquéllas poseen sistemas de transportadores (*carriers*) y permeasas involucrados en el transporte activo. La existencia de un sistema endomembranoso determina la aparición de gradientes iónicos y potenciales eléctricos a través de estas membranas intracelulares.

APARATO DE GOLGI

8-18. El aparato de Golgi modifica las proteínas, las clasifica y las dirige a su destino

Anteriormente se mencionó que el aparato o complejo de Golgi es una parte diferenciada del sistema de endomembranas. Este componente membranoso está relacionado espacialmente con el retículo endoplasmático y con la membrana plasmática. Pese a que no existen comunicaciones directas entre el Golgi, el retículo y la membrana, hay

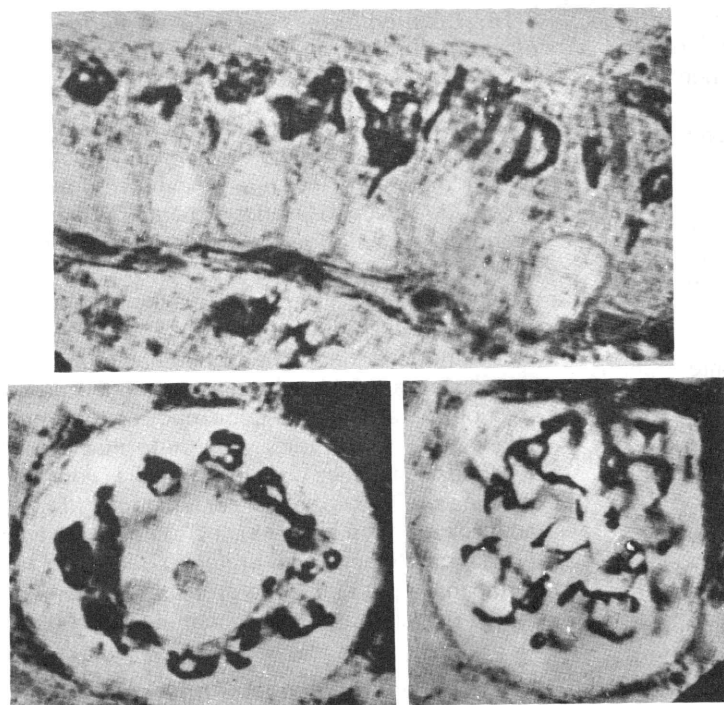


FIG. 8-15. Arriba. Aparato de Golgi en células tiroideas de cobayo, en posición apical. Impregnación ósmica. Abajo, izquierda. Célula ganglionar con aparato de Golgi perinuclear. Abajo, derecha. Idem; sección óptica tangencial con respecto al núcleo. Impregnación argéntica.

un extenso tránsito de vesículas entre esas estructuras, las cuales intercambian sus membranas y contenidos.

La historia del aparato de Golgi es larga y conflictiva. En 1898, Camilo Golgi, utilizando un método de coloración argéntica, describió una estructura reticular en las células nerviosas (fig. 8-15) a la que denominó "aparato reticular interno" y que ahora lleva su nombre.

En preparaciones teñidas, las extremadas variaciones de forma, tamaño, posición y estructura aparentes del aparato de Golgi en los diversos tipos celulares, e incluso en distintas etapas funcionales de la misma célula, originaron desde un principio controversias sobre su verdadera naturaleza. Hasta pasada la mitad del siglo muchos citólogos negaban su existencia e interpretaban que su aspecto se debía a un artificio de técnica histológica; este punto de vista era reforzado también por el hecho de que no podía ser observado en la célula viva, debido a que su índice de refracción es semejante al del citosol.

Sin embargo, la microscopia electrónica permitió establecer su morfología característica y se pudo estudiar su estructura en detalle. Más tarde contribuyeron a este estudio el uso de cortes gruesos y el microscopio electrónico de alto voltaje, la criofractura (fig. 3-9) y la observación de las membranas de Golgi aisladas mediante coloración negativa. Otros adelantos fueron aportados por la radioautografía con precursores especiales, y el fracciona-

miento celular que permitió la obtención de fracciones purificadas, lo cual facilitó el estudio bioquímico. Con estos y otros progresos, la estructura y funciones de este organoide se han dilucidado en gran parte.

En este capítulo, además de la morfología y la citoquímica del complejo de Golgi, analizaremos sus funciones e insistiremos en particular en el papel de este organoide en la *glucosidación definitiva* de las glucoproteínas y de los glucolípidos, así como en la *segregación* y la *guía* de productos hacia sus destinos finales.

Uno de esos posibles destinos es el exterior celular, por lo cual veremos que en algunas células glandulares el aparato de Golgi tiene un importante papel, que fue el primero en ser entrevisto por los citólogos clásicos, que habían observado que los gránulos de secreción aparecían inicialmente en estrecha relación con el aparato de Golgi, para después separarse de éste y acumularse en el citoplasma apical.

También como parte de la guía proteica mencionada, este organoide selecciona, concentra y empaqueta a las enzimas de los lisosomas, los que se originan en una región especial del Golgi.

En resumen, el aparato de Golgi otorga a las glucoproteínas y a los glucolípidos sus oligosacáridos definitivos, y actúa como un centro de selección capaz de discriminar entre miles de proteínas diferentes, de modo de poder dirigir a cada una de ellas hacia su meta intracelular o extracelular.

8-19. El aparato de Golgi, o complejo de Golgi, está constituido por un conjunto de dictiosomas

El aparato de Golgi está presente en todas las células nucleadas. Aunque su localización, tamaño y desarrollo varían en los distintos tipos celulares y también con el estado fisiológico de cada célula, el complejo de Golgi presenta características morfológicas que hacen posible diferenciarlo de los otros componentes del sistema de endomembranas.

Morfológicamente es muy parecido en las células vegetales y animales (fig. 8-15). El aspecto reticular que presenta en el microscopio óptico (fig. 8-14) responde a la aparente superposición de imágenes de subunidades menores denominadas *dictiosomas*. Este nombre fue acuñado por Perroncito, quien en 1910 observó lo que parecía ser una fragmentación del Golgi en células en división y denominó así a cada una de esas subunidades.

Cada uno de los dictiosomas, que mide no más de 1 μm de ancho y tiene una altura bastante menor, está constituido por cisternas discoidales aplanadas, paralelas y superpuestas a modo de pilas de platos, formadas por membranas lipoproteicas en las que se inserta una gran variedad de enzimas específicas. Estas membranas carecen de ribosomas.

Por lo general el microscopio electrónico permite reconocer en el dictiosoma a sus tres elementos membranosos típicos:

- 1) *sacos aplanados* (es decir, cisternas);
- 2) grupos de *vesículas* de unos 60 nm, y
- 3) grandes *vacuolas* ocupadas por un contenido amorfo o granular.

Las cisternas del Golgi se disponen en pilas paralelas, separadas por un espacio ocupado por el citosol de 20 a 30 nm. A menudo las cisternas adoptan una organización curvada concéntrica, con una cara convexa y otra cóncava. En la mayor parte de las células animales y vegetales su número varía entre tres y siete, aunque en las algas y organismos inferiores pueden encontrarse veinte o más cisternas.

Como vimos en el capítulo 5, en las células existe una región de citoplasma denominada "centro celular" donde se ubica el centrosoma con el par centriolar y sus estructuras anexas. El aparato de Golgi suele localizarse en estrecha relación con el centrosoma, de modo que aparece rodeado por un citoplasma del cual están excluidos la mayoría de los ribosomas y también el glucógeno y las mitocondrias.

En relación con esta zona terminan, como ya analizamos, los extremos (–) de los microtúbulos del citoplasma, lo que resulta esencial para el transporte de los materiales que se originan en el Golgi.

En muchos tipos celulares, como los leucocitos, las células de Leydig y otras, los dictiosomas se ordenan en el citoplasma formando una especie de hemisfera hueca, con el par centriolar en su interior.

En las células epiteliales secretoras, que en general poseen una estructura polarizada, el Golgi suele conformar una estructura aparentemente única y bastante extensa (constituida, como vimos, por múltiples dictiosomas agrupados), que ocupa una posición definida entre el núcleo y el polo de la célula donde se libera la secreción. Esta disposición se observa, por ejemplo, en las células de la tiroides (fig. 8-14), en el páncreas exocrino o en las células mucosas del epitelio intestinal. Por el contrario, en las neuronas (fig. 8-14) y en la mayoría de las células vegetales hay muchos dictiosomas que no manifiestan ninguna orientación citoplasmática especial. En las células musculares son pequeños y se ubican cerca de los polos nucleares. En las células hepáticas se calcula que existen unos 50 dictiosomas que se congregan especialmente en torno de los canalículos biliares y representan alrededor del 2% del volumen citoplasmático total.

8-20. Los dictiosomas tienen una cara *cis*, *proximal* o *formadora* y otra *trans*, *distal* o *en vías de maduración*

Cada uno de los dictiosomas es una estructura polarizada, con una cara denominada *cis* (proximal o formadora), generalmente convexa y más cerca de la envoltura nuclear, y una cara *trans* (distal o en vías de maduración), cóncava, que rodea a la región que contiene vesículas grandes (fig. 8-16). Como los dictiosomas asociados por sus bordes laterales para formar el complejo de Golgi se orientan todos de la misma manera, el organoide mismo está también polarizado. El denominado *eje cis-trans* del complejo de Golgi hace referencia al sentido de esta polarización. La cara *cis* se caracteriza por la presencia de pequeños *túbulos* y *vesículas de transición* que forman una especie de placa fenestrada (*retículo cis-Golgi*) (fig. 8-16, D_2) que converge sobre la primera cisterna del Golgi (cisterna *cis*). Estos elementos de transición son membranas sin ribosomas que se forman por evaginación del RE y migran hacia el Golgi, con el que se fusionan y al que proveen de sus elementos membranosos y su contenido proteico. Este flujo de vesículas, que es unidireccional, lleva entonces al Golgi la mayor parte de las proteínas sintetizadas en el RER, y compensa también la pérdida de membranas que tiene lugar en la cara *trans* por la liberación de vesículas y vacuolas con el material procesado. El tránsito vesicular unidireccional también es el mecanismo de transporte de las proteínas de una cisterna a otra del Golgi, siempre en la dirección *cis*→*trans*.

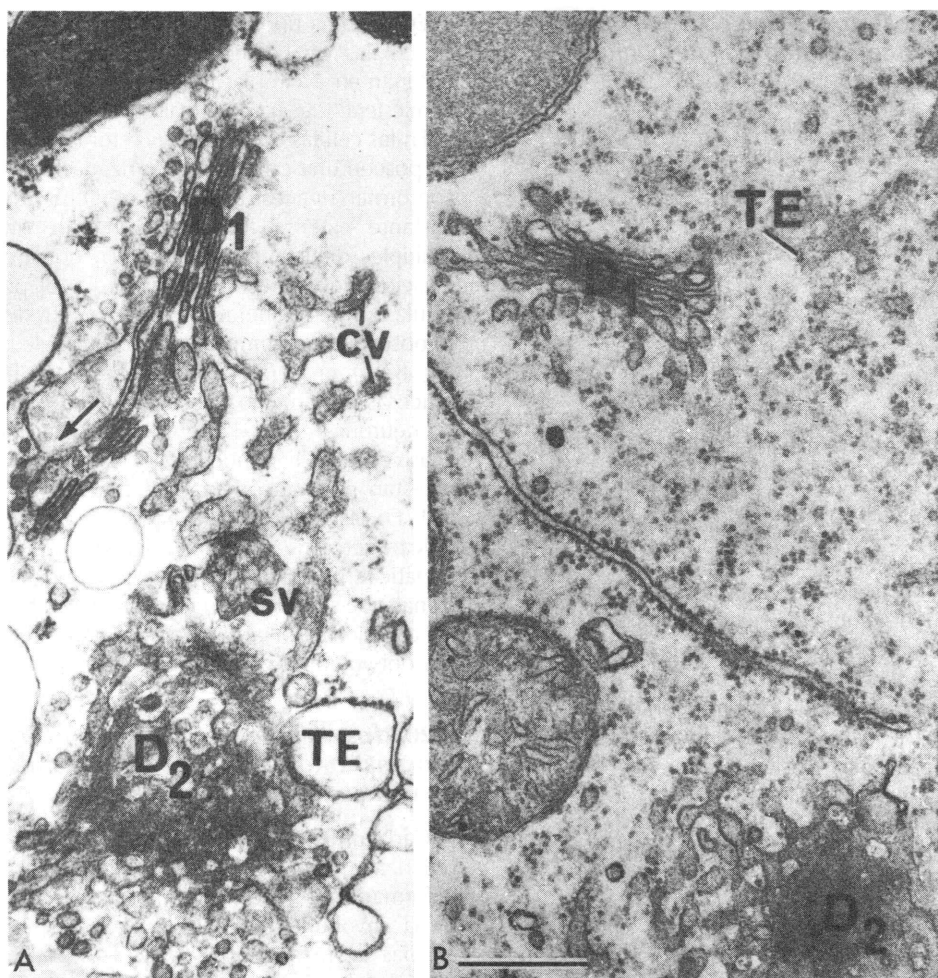


FIG. 8-16. Micrografías electrónicas del aparato de Golgi. **A.** En hígado de rata. **B.** En raíz de cebolla. D₁, corte transversal de un dictiosoma que permite observar las cisternas apiladas; D₂, dictiosoma en corte tangencial, en el que se aprecia una cisterna con una región central plana y una periférica fenestrada; TE, elemento de transición del retículo endoplasmático adyacente al Golgi; CV, vesícula con cubierta. SV, vesículas secretorias. Con una flecha se indica la unión entre el RE liso y una vesícula secretoria. 35.000×. (Cortesía de D. J. Morré.)

Frecuentemente, más allá de la última cisterna de la cara trans se encuentra una zona formada por túbulos y vesículas ricos en fosfatasa ácida, a la que Novikoff denominó *GERL* (fig. 8-1). Este acrónimo significa "región de RE asociada al Golgi que está vinculada con la producción de lisosomas". El concepto no tuvo mayor aceptación, y a toda la región asociada con la cisterna más distal del complejo de Golgi, con sus tubos, vesículas, y vacuolas asociadas, se la denomina *retículo trans-Golgi* o TGN (*trans Golgi network*).

8-21. La polarización de los dictiosomas implica la diferenciación de la membrana

La polarización del dictiosoma es tanto funcional como morfológica. A las diferencias en la dotación

enzimática de las distintas regiones del Golgi, evidenciables con métodos histoquímicos, debemos agregar diferencias estructurales de sus componentes membranosos. Como se indica en la tabla 8-4, hay un aumento progresivo del espesor de la membrana desde el RE al Golgi y desde éste hacia la membrana plasmática; esta variación se encuentra aun dentro de las cisternas de un mismo dictiosoma.

Otra evidencia de la polarización del aparato de Golgi es proporcionada por el hecho de que existe un gradiente de colesterol desde las pilas cis a las trans. En la figura 8-17 se muestra un hepatocito de rata cultivado con filipina, una droga que forma complejos con el colesterol. Estos complejos pueden detectarse con el microscopio electrónico luego de la congelación-fractura de la muestra. Obsérvese que los complejos filipina-esterol están ausen-

TABLA 8-4. Diferenciación de las membranas en el aparato de Golgi de animales y vegetales
(D. J. Morré [1977])

Tipo de membrana	Espesor de la membrana			
	Hígado de rata	Glándula mamaria de rata	Tallo de cebolla	Hipocótilo de soja
Envoltura nuclear	65	60	56	56
Retículo endoplasmático	65		53	56
Aparato de Golgi				
Cisterna 1	65	70	53	56
Cisterna 2	68		60	58
Cisterna 3	72		65	61
Cisterna 4/5	80		75	69
Vesícula secretoria	83	85	88	78
Membrana plasmática	85	97	93	88

tes en la región cis, comienzan en las cisternas mediales y aumentan en la región trans.

En las células secretoras de proteínas, la cavidad de las cisternas suele estar ocupada por el material proteico, que es visible como un contenido granuloso que se va condensando progresivamente hacia la superficie distal.

Existen también diferencias de coloración; así, las cisternas de la cara proximal se tiñen fuertemente con el tetróxido de osmio, mientras que la coloración para glucoproteínas (por ejemplo, ácido per-yódico-metenamina) aumenta hacia la cara distal. La demostración histoquímica de la *tiamina pirofosfatasa* permite localizarla sólo en la región trans



FIG. 8-17. Micrografía electrónica de hepatocitos de rata cultivados en presencia de filipina y sometidos al método de congelación-fractura, que muestra la distribución diferencial de los complejos filipina-esterol en distintas regiones de las pilas de Golgi. La fractura de la membrana revela que las cisternas cis (flechas) están desprovistas de complejos filipina-esterol, mientras que éstos se encuentran en las cisternas mediales (flechas dobles) y aumentan en las cisternas trans (asterisco). 55.000×. (Cortesía de J. Roth.)

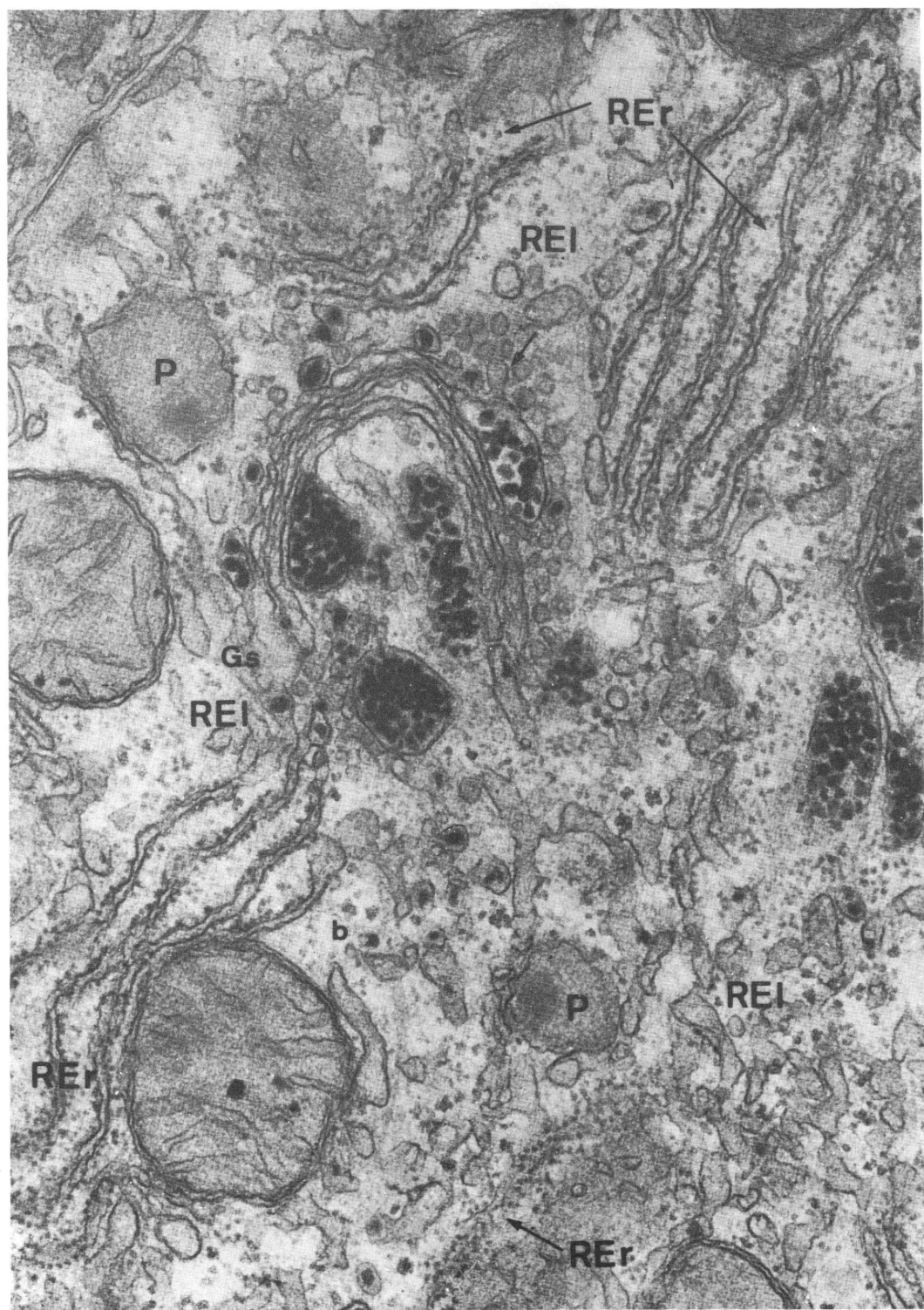


FIG. 8-18. Microscopia electrónica de la célula hepática de un animal sometido a una dieta rica en grasas, que permite observar la síntesis y el transporte de los gránulos de lipoproteína. Se observa el retículo endoplasmático rugoso (REr) bajo la forma de dos pilas de cisternas que convergen hacia un complejo de Golgi que presenta cisternas de Golgi (Gs) sobre su cara convexa o “de formación”. También se aprecian porciones de retículo endoplasmático liso (REI) que conectan ambas partes del sistema vacuolar, y mitocondrias con gránulos matriciales y peroxisomas (P). 56.000×. (Cortesía de A. Claude.)

del Golgi. Por otro lado, la *fosfatasa ácida* aparece aún más distalmente, en la región relacionada con los lisosomas (fig. 8-1).

En las células hepáticas, las diferencias entre las distintas regiones del Golgi también pueden observarse en ciertas condiciones experimentales (por ejemplo, dieta rica en grasas). Esto hizo posible seguir la síntesis y transporte de las *lipoproteínas*, que aparecen como gránulos densos discretos de aproximadamente 40 nm. Como se muestra en la figura 8-18, estos gránulos aparecen primero dentro de los túbulos del RE liso y luego penetran en las cisternas fenestradas externas de la región del retículo cis-Golgi. Después de períodos más prolongados se acumulan en las grandes vacuolas que se forman por dilatación del borde de las cisternas y, por último, son eliminados en vesículas de secreción.

8-22. El aparato de Golgi pudo ser estudiado bioquímicamente

Se ha logrado el aislamiento del complejo de Golgi de numerosas células animales y vegetales. Los métodos empleados se basan en una homogeneización suave, que tiende a preservar las pilas de cisternas; pueden obtenerse así grandes fragmentos de complejo de Golgi mediante la centrifugación

diferencial en gradientes. Los complejos de Golgi tienen una densidad específica más baja que el retículo endoplasmático y las mitocondrias, y se equilibran en una banda de densidad 1,16.

Vistas con el microscopio electrónico, las cisternas apiladas aparecen bordeadas por un extenso sistema de túbulos y vesículas —dentro de las cuales permanecen los productos de secreción— (fig. 8-19). Cuando los complejos de Golgi son lavados en agua destilada, se obtiene una purificación mayor, con pérdida de los componentes de secreción.

Se ha logrado el subfraccionamiento del aparato de Golgi, después de separar las cisternas del dictiosoma, mediante el uso de enzimas proteolíticas. Así se han separado fracciones más ricas en vesículas secretorias de otras que contienen principalmente cisternas y otras porciones de Golgi.

El análisis bioquímico de estas fracciones purificadas de membranas del aparato de Golgi ha permitido obtener información sobre la composición de las diferentes membranas y compararlas con la del RE y las membranas plasmáticas aisladas de la misma forma.

El complejo de Golgi aislado a partir del hígado de rata contiene alrededor de 60% de proteínas y 40% de lípidos. Mediante la electroforesis en gel se demostró que el Golgi y el RE poseen algunas proteínas en común, pero que el primero tiene menos

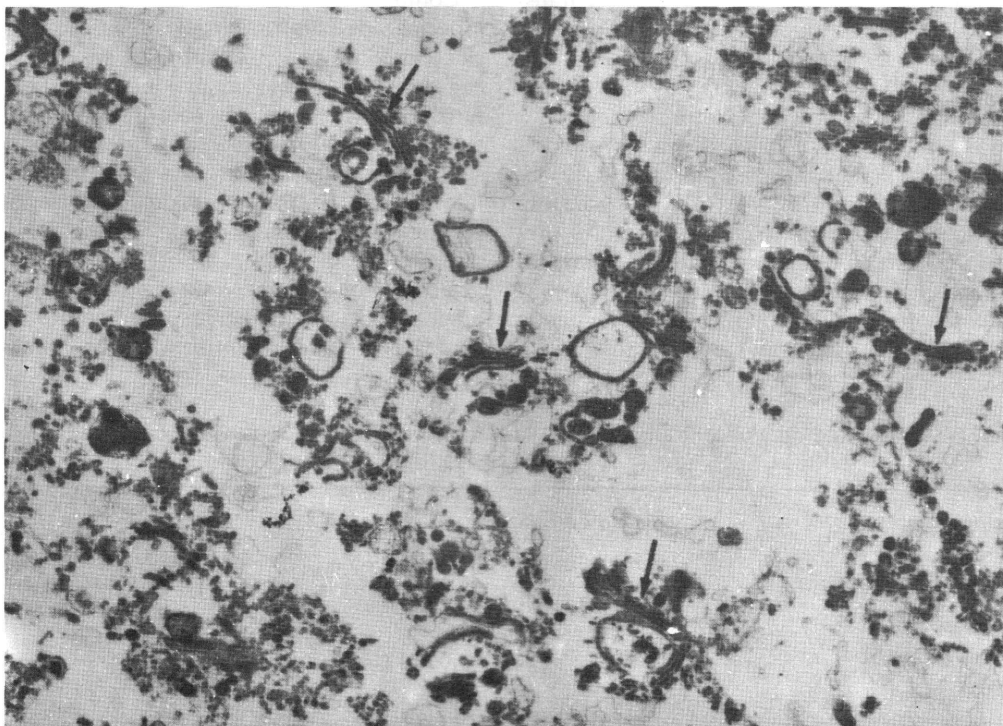


FIG. 8-19. Complejos de Golgi aislados en el hígado. Con flechas se indican algunos en los que se observa la disposición paralela de las cisternas. (Cortesía de D. J. Morré.)

bandas de proteínas que el segundo, y más que la membrana plasmática. Esta complejidad cada vez menor de las proteínas desde el RE hacia la membrana plasmática es de alguna manera coherente con el hecho de que la síntesis de las proteínas de membrana tiene lugar en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso y son transferidas posteriormente a otras porciones del sistema vacuolar.

Estudios realizados en aparatos de Golgi de diferentes células animales y vegetales demostraron diferencias en el contenido de proteínas y enzimas.

El aparato de Golgi muestra una composición fosfolipídica intermedia entre el RE y la membrana plasmática. En los vegetales hay grandes cantidades de ácido fosfatídico (80-40%) y fosfatidilglicerol, lo que contrasta con la riqueza de fosfatidilcolina en el Golgi del hígado.

En los vegetales falta el ácido siálico, que es abundante en el hígado, el cual tiene glucoesfingolípidos. Tanto en las células animales como vegetales hay monosacáridos como glucosamina, galactosa, glucosa, manosa y fucosa; pero en las plantas hay además pentosas como xilosa, arabinosa y otros hidratos de carbono especiales.

8-23. Las glucosiltransferasas se concentran en el complejo de Golgi

La mayor parte de las enzimas características del Golgi están relacionadas con la remoción y transferencia de monosacáridos a los oligosacáridos de los precursores de glucoproteínas —es decir, son *glucosiltransferasas*— para formar las glucoproteínas maduras (véase más adelante). La tabla 8-5 muestra la actividad específica de cuatro glucosiltransferasas involucradas en la transferencia de ácido CMP-neuramínico (CMP-NANA), UDP-galactosa y UDP-acetilglucosamina a los oligosacáridos precursores, las cuales están altamente concentradas en la fracción de Golgi de hígado de rata.

Dijimos antes que el complejo de Golgi puede ser subdividido en fracciones de diferente densi-

dad. En el hígado de rata el subfraccionamiento se facilita si se administra etanol al animal antes de sacrificarlo. Este tratamiento produce la acumulación de lipoproteínas de baja densidad dentro de las vacuolas de Golgi, de manera similar a lo que ocurre en el caso ilustrado en la figura 8-18 con una dieta rica en grasas.

Esta condición experimental facilita la separación de una fracción liviana o FG₁, que contiene grandes vesículas llenas de lipoproteínas; una fracción intermedia o fracción FG₂ similar a FG₁, pero con algunas cisternas y vesículas más pequeñas, y una fracción FG₃ o pesada, en la cual predominan las cisternas de Golgi y vesículas pequeñas y vacías. En cierta manera estas fracciones siguen la polarización cis-trans del complejo antes mencionado, en este orden:

$$FG_3 \rightarrow FG_2 \rightarrow FG_1$$

Las membranas del Golgi contienen también enzimas que se hallan en el RE, como NADH citocromo b₅ reductasa, NADH citocromo c reductasa y 5-nucleotidasa.

8-24. El dictiosoma presenta por lo menos tres compartimientos funcionalmente diferenciados en el procesamiento del oligosacárido precursor

Como ya vimos, la cara cis del dictiosoma está especializada para recibir a las miles de diferentes glucoproteínas recién sintetizadas en el RER —recuérdese que en ese organoide se transfiere a las proteínas nacientes el oligosacárido N-unido, de 14 monosacáridos, proveniente del dolicol—, las que son transportadas por medio de las vesículas de transferencia. En las cisternas de la cara cis continúa el proceso de modificación del componente oligosacárido inicial.

Del *compartimiento proximal*, las proteínas (las luminales y las membranosas) son transportadas hacia las cisternas del *compartimiento medial* me-

TABLA 8-5. Actividad de glucosiltransferasa en la fracción del complejo de Golgi del hígado de rata
(Morré et al. [1971])

Glucosiltransferasa	Actividad específica en:		Porcentaje de actividad total en el complejo de Golgi
	Homogeneizado total	Complejo de Golgi	
Sialiltransferasa	50	422	44
Galactosiltransferasa	11	128	42
N-acetilglucosaminiltransferasa	24	219	43
Galactosil-N-acetilglucosamina tr.	6	64	40

La actividad específica de las cuatro glucosiltransferasas está expresada en nanomoles/hora/mg del azúcar del nucleótido unido al aceptor de proteína. (Datos del Prof. H. Schachter.)

diante la generación, movilización y fusión de nuevas vesículas. En el compartimiento medial continúa la maduración proteica por otros sistemas enzimáticos, y por un mecanismo de transporte vesicular similar al anterior, las proteínas son finalmente transferidas hacia el *compartimiento distal*, donde se completan las transformaciones bioquímicas y las diferentes proteínas son seleccionadas y separadas físicamente para dirigirse hacia la vía secretora o hacia otros compartimientos celulares.

Dado que el número de cisternas en el dictiosoma es variable, puede existir algún compartimiento con más de una cisterna. El mínimo de cisternas posibles en un dictiosoma se comprende que sea de tres.

Cabe notar que ya no se acepta la interpretación original de que en la cara proximal se formarían continuamente nuevas cisternas cis por la confluencia de las vesículas de transferencia, y que las cisternas irían transformándose en mediales y luego en distales hasta ser disgregadas como vesículas y vacuolas en el retículo trans-Golgi. Por el contrario, cada cisterna cis, medial o trans permanece siempre como tal, aunque está en constante renovación.

Los estudios combinados de fraccionamiento en gradientes de densidad y de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales permitieron establecer que cada compartimiento posee enzimas características:

a) El *compartimiento cis* probablemente sea el responsable de la fosforilación de la manosa del oligosacárido precursor y de la remoción de la manosa no fosforilada.

b) El *compartimiento medial* también remueve manosa, pero principalmente agrega residuos de N-acetilglucosamina al oligosacárido.

c) El *compartimiento trans* remueve galactosa y comienza a agregar ácido siálico o N-acetilneuramínico (NANA). El procesamiento del oligosacárido N-unido finaliza con el agregado de los últimos ácidos siálicos en el retículo trans-Golgi, donde también se produce la separación física de los grupos de proteínas de acuerdo con sus destinos.

8-25. La síntesis de glucoesfingolípidos y la modificación de las glucoproteínas es una de las funciones principales del aparato de Golgi

Este organoide interviene en la provisión del componente hidrocarbonado definitivo de glucolípidos y glucoproteínas. Como vimos, el esqueleto polipeptídico de la glucoproteína es sintetizado sobre los ribosomas unidos a la membrana y penetra en el RER por el mecanismo del péptido señal. Dentro del RER, el núcleo oligosacárido es transfe-

rido a la proteína naciente por un precursor oligosacárido-dolicol pirofosfato. En el complejo de Golgi se extraen monosacáridos, en especial manosa, y se agregan las cadenas laterales terminales de galactosa, N-acetilgalactosamina y ácido siálico por varias glucosiltransferasas específicas (galactosiltransferasa, N-acetilglucosaminotransferasa y sialiltransferasa) (tabla 8-5). Además se agregan grupos fosfato, sulfato o ácidos grasos. Estos procesos dan lugar a miles de oligosacáridos específicos para cada tipo proteico, que otorgan a cada una de las proteínas un sello distintivo que le es característico. La manera por la cual se glucosida a cada proteína de manera especial según sus características aún se desconoce.

Recuérdese que al analizar la glucosidación inicial de las proteínas en el RER habíamos dicho que no todas las glucoproteínas maduras poseen oligosacáridos N-unidos. Unas pocas poseen oligosacáridos más simples, O-unidos a la serina, treonina o hidroxilisina de la cadena polipeptídica, que se agregan de manera poco conocida en el aparato de Golgi por acción de las glucosiltransferasas que ya vimos.

Algunas de las glucoproteínas que llegan al aparato de Golgi son glucosiladas con tanta intensidad que el componente hidrocarbonado se torna cuantitativamente mucho más importante que el proteico. Este es el caso de los *proteoglucanos*, que se originan en el aparato de Golgi y son incorporados a glóbulos de mucígeno en células glandulares, integrados al glucocáliz de las membranas o exocitados hacia las matrices extracelulares (caps. 4 y 6). Sus *glucosaminoglucanos* (GAGs) suelen estar sulfatados. Estos grupos SO_4^{2-} son sintetizados y agregados, como ya vimos, por el Golgi.

El aparato de Golgi también desempeña un papel central en la biosíntesis de los gangliósidos y otros glucoesfingolípidos. Se ha comprobado que varias de las glucosiltransferasas que intervienen en la glucosidación de glucoesfingolípidos están concentradas en el aparato de Golgi y en menor grado en el RE. La síntesis de glucoesfingolípidos se produce mediante el agregado en secuencia de monosacáridos (nucleótidos-monosacáridos) a la ceramida o al aceptor glucolípido.

8-26. La glucosidación de lípidos y proteínas está alterada en las células cancerosas

En la superficie celular de las células cancerosas hay cambios que comprenden la pérdida de glucoesfingolípidos, y esta alteración se debe en parte a la disminución de una o más de las glucosiltransferasas del Golgi. En la actualidad se está prestando mucha atención al papel que revisten los cambios

en las glucoproteínas y los glucoesfingolípidos de la superficie celular en el desarrollo de las propiedades de malignidad de las células cancerosas. Algunos de estos cambios fueron mencionados en el capítulo 6.

SECRECIÓN DE PROTEÍNAS POR LA CELULA

8-27. La secreción celular de proteínas es un proceso complejo en el que interviene todo el sistema de endomembranas

Es justificado considerar aquí la secreción celular en relación con el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, porque estos organoides intervienen directamente en la síntesis, transporte y liberación de las macromoléculas que serán excretadas por la célula. La relación entre el Golgi y la secreción fue

propuesta por Cajal, en 1914, al estudiar las células caliciformes.

La secreción no está limitada a las células animales, puesto que las vegetales secretan polisacáridos y proteínas para fabricar la pared celular. Generalmente se puede decir que la secreción comienza ya en las células procarióticas, puesto que las bacterias producen la pared celular y liberan varias enzimas al medio.

En algunos protozoos hay vacuolas que se asemejan al complejo de Golgi y cuya función es la de contraerse y expeler agua al medio.

La figura 8-20 es una representación hipotética de la síntesis de una glucoproteína y de las vías alternativas de su incorporación a la membrana o de su secreción, que muestra la participación de los distintos segmentos del sistema endomembranoso: RE rugoso y liso, membranas del Golgi, vesículas de secreción y membrana plasmática.

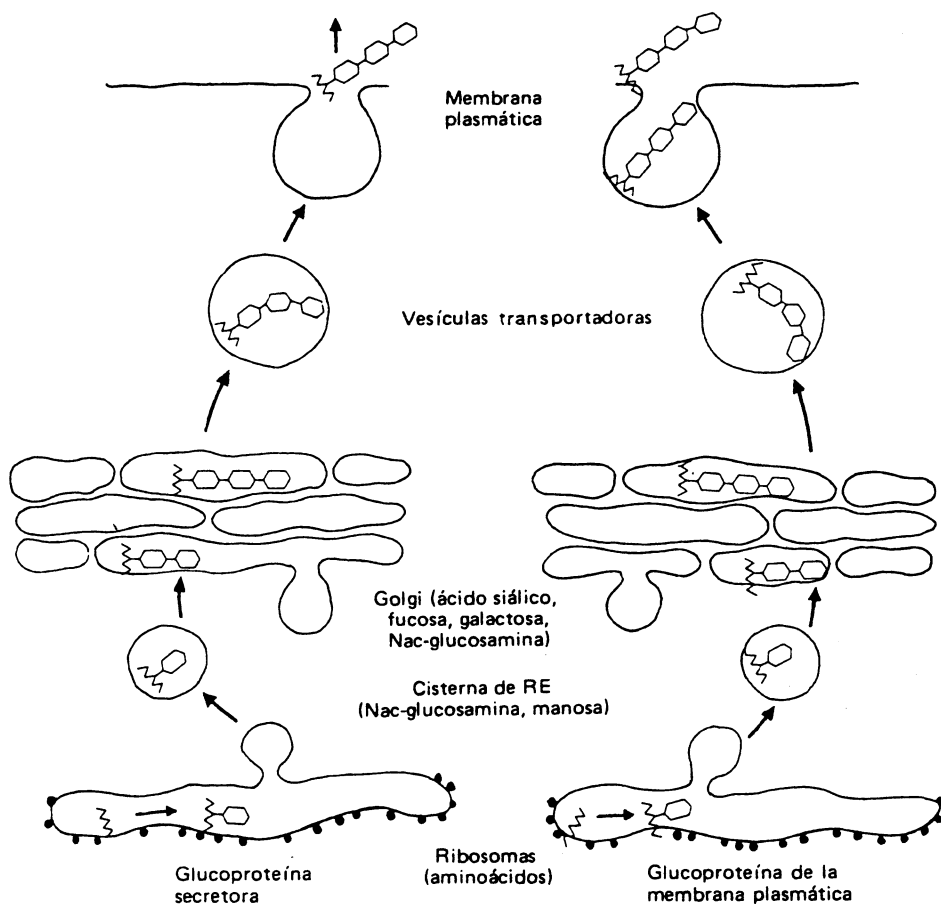


FIG. 8-20. Esquema modificado de Schachter, en el que se comparan los mecanismos para la elaboración de glucoproteínas secretoras (izquierda) y de la membrana plasmática (derecha). Mientras que las glucoproteínas secretoras son liberadas en la luz del RE, las de la membrana plasmática quedan unidas a la pared del RE y son transportadas por flujo de membrana. Los diversos oligosacáridos se agregan en secuencia en el RER y en el aparato de Golgi. A partir del Golgi las glucoproteínas son llevadas por vesículas transportadoras y liberadas por exocitosis a nivel de la membrana plasmática. (Cortesía de C. P. Leblond y G. Bennett.)

8-28. La secreción puede ser constitutiva o regulada

Ambas formas de secreción difieren en el mecanismo de liberación del producto secretorio, que puede necesitar o no de un estímulo apropiado que suele actuar mediante la generación de segundos mensajeros (cap. 7-5).

En la *secreción constitutiva* la producción proteica es continua y el producto se descarga apenas es elaborado. Por ejemplo, en la secreción de colágeno por el fibroblasto, la proteína es transportada a la superficie celular en vesículas excretoras muy pequeñas no visibles con el microscopio óptico, que no se acumulan en el citoplasma. La producción de inmunoglobulinas en los plasmocitos o de proteínas séricas en los hepatocitos no se acompaña de la formación de ningún tipo de gránulo secretor especial. Vale decir que en estos casos la salida del producto de secreción es más o menos simultánea con la síntesis y el transporte intracelular de estas sustancias. Esta característica de liberación continua de la secreción constitutiva se debe a que las membranas de las vesículas secretorias poseen propiedades especiales (provistas por el aparato de Golgi) con tendencia espontánea a la fusión con la cara citosólica de la membrana plasmática.

En la *secreción facultativa* que caracteriza a otras células, como las adenohipofisarias, las neuronas, los mastocitos y otras, la síntesis es más o menos continua, pero el producto secretorio es almacenado en el citoplasma en gránulos especiales, cuyas membranas poseen características particulares (provistas por el aparato de Golgi) que hacen que nunca sean exocitados en ausencia de un estímulo específico. Este puede ser un neurotransmisor, un ion, una hormona o alguna otra señal molecular, según el tipo celular, y actúa por lo general sobre receptores de membrana relacionados con proteínas G que activan la vía del calcio o del AMPc (cap. 7-6). En estas células el proceso secretorio tiene expresiones citológicas muy variadas, pero suele caracterizarse por la presencia de productos visibles con el microscopio óptico que se acumulan en la célula antes de ser eliminados. Estos pueden aparecer en forma de gránulos refringentes, vacuolas, gotas u otras estructuras con localización intracelular característica. Los gránulos densos que contienen enzimas, generalmente en forma inactiva (proenzimas), se llaman *gránulos de zimógeno* (fig. 8-21, A).

8-29. Ciertas proteínas de secreción deben sufrir modificaciones moleculares para convertirse en funcionales

Es un hecho bien conocido que muchas de las proteínas secretadas se sintetizan primero como un

precursor inactivo, que luego es activado. En general, la activación consiste en la remoción de una parte de la cadena polipeptídica, y puede ocurrir en diferentes sitios. Por ejemplo, los zimógenos del páncreas se activan extracelularmente, es decir, después que han sido liberados.

Como vimos al tratar el RER, diversas hormonas polipeptídicas se producen como prohormonas inactivas que luego son activadas intracelularmente por medio de enzimas proteolíticas de conversión presentes en el Golgi.

Entre algunos ejemplos de proproteínas podemos citar la proparathormona, el proglucagón, la progastrina y el bien conocido caso de la proinsulina. La hormona insulina, producida por las células β de los islotes del páncreas, tiene un peso molecular de 12 kDa y dos cadenas (la cadena A de 21 y la B de 30 aminoácidos) unidas por dos puentes $-S-S-$. En la figura 8-22 se representa el ARN mensajero de la insulina con las regiones A y B que codifican ambas cadenas. Además el ARNm contiene la región que codifica el péptido señal, el segmento C y el extremo de poli A. Este ARNm contiene información para codificar una cadena de 330 aminoácidos, y la traducción completa de este mensaje da lugar a la preproinsulina. Sin embargo, como se describió anteriormente, en el RER el péptido señal (23 aminoácidos para la insulina) es removido por la peptidasa señal. La cadena de proinsulina es luego activada en el Golgi por la extracción del péptido C a cargo de la enzima de conversión. Finalmente, la insulina y el péptido C inactivo quedan en el gránulo de secreción.

En el caso de la proalbúmina se ha propuesto un posible mecanismo que asocia el procesamiento de la proteína con la exocitosis. En este caso la conversión en albúmina depende de la fusión de pequeñas vesículas del Golgi que contienen una proteasa.

El procesamiento molecular de la secreción es importante, ya que éste implica que los productos de fragmentación pueden tener diferentes funciones. Por ejemplo, en las células de la hipófisis un único precursor contiene la hormona adrenocorticotrópica y la β -endorfina, un péptido con actividad de opiáceo (fig. 7-23).

8-30. El proceso secretorio del páncreas presenta seis etapas consecutivas

Como ejercicio de integración de muchas de las funciones del sistema de endomembranas es útil considerar el proceso secretorio.

Las células exocrinas del páncreas secretan, de manera regulada, tripsinógeno, lipasa y amilasa en grandes cantidades. Por tal motivo es conveniente analizar este tipo celular para ilustrar los procesos

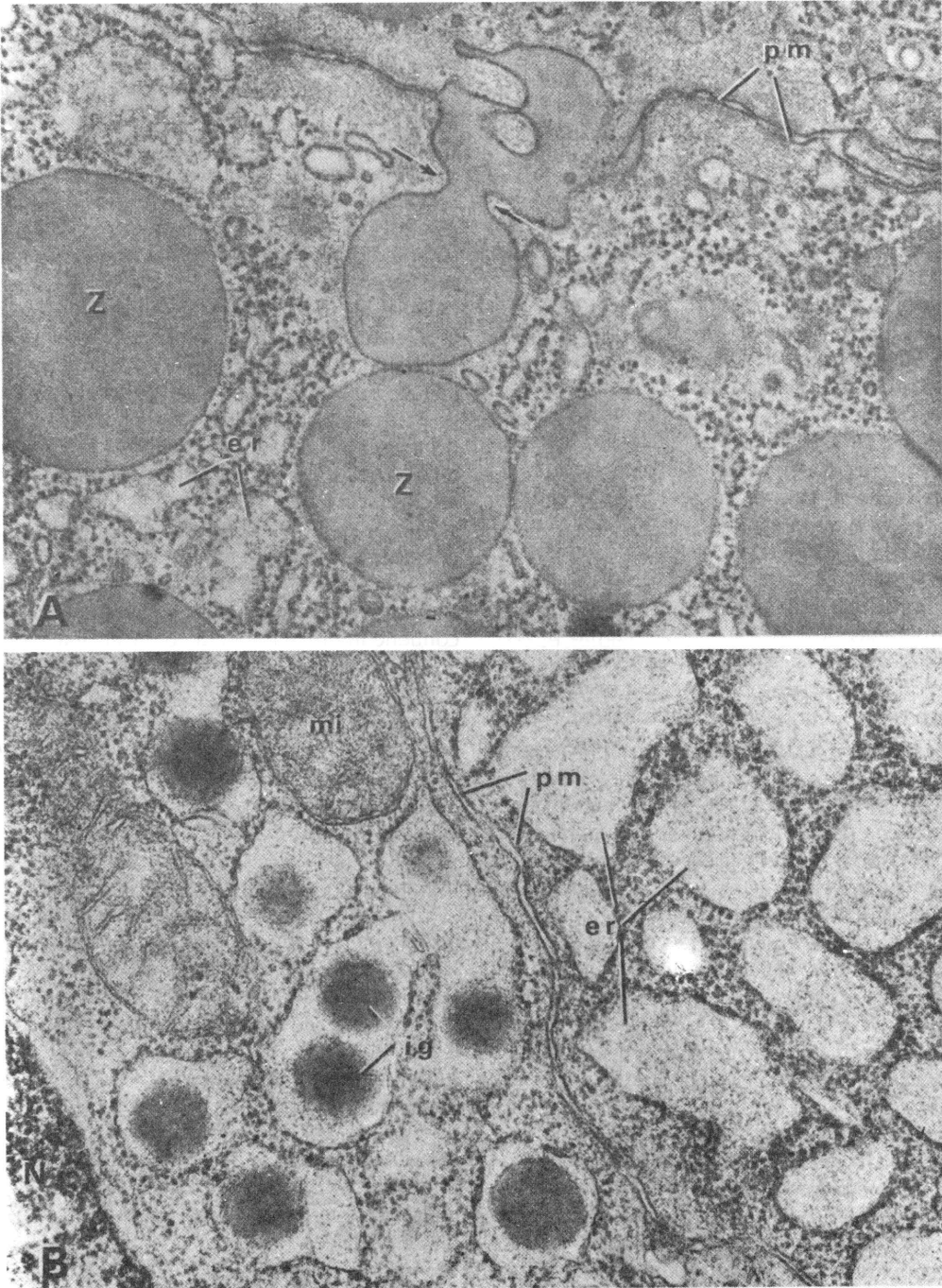


FIG. 8-21. **A.** Región apical de una célula pancreática de cobayo en la que se advierten los gránulos de zimógeno (Z), uno de los cuales se halla en proceso de expulsión por exocitosis. er, retículo endoplasmático rugoso; pm, membrana plasmática. (Cortesía de C. E. Palade) **B.** Región basal de una célula similar que muestra cisternas del RER ensanchadas. Algunas de ellas contienen gránulos intracisternales (ig). mi, mitocondria; N, núcleo. 30.000X. (Cortesía de D. Zambrano.)

secuenciales que van desde la síntesis hasta la liberación extracelular de la secreción, ya que en estas células las estructuras involucradas alcanzan su máximo grado de desarrollo. En el proceso secretorio

del páncreas exocrino —que a veces es denominado incorrectamente “ciclo secretor”— se reconocen seis etapas en las que intervienen los componentes del sistema de endomembranas (fig. 8-23):

1. **Etapa ribosómica.** Es la que corresponde a la síntesis de las proteínas por los polirribosomas adheridos al RE. Como vimos antes, en realidad esta etapa se inicia en el citosol en ribosomas libres.

2. **Etapa cisternal.** Corresponde al transporte vectorial de la proteína sintetizada hacia el interior de las cisternas del RER. Es necesario recordar el mecanismo de unión del ribosoma a la membrana, el mecanismo de la señal (con el péptido señal y la peptidasa), la glucosidación inicial y los demás procesos por los cuales la proteína es procesada y acumulada dentro del RE. En la mayoría de los casos el material aparece en la luz del RER como una solución diluida de macromoléculas, pero en ocasiones se ven pequeños gránulos intracisternales (fig. 8-21, B).

3. **Etapa de transporte intracelular.** Se observa que las proteínas son transportadas a través del RE rugoso y entran en los elementos de transición situados en el límite entre aquél y el complejo de

Golgi. Estos elementos de transición carecen de ribosomas en la mayor parte de la superficie, excepto en la región que mira hacia el RER. En la parte vecina al retículo cis-Golgi son lisos y producen vesículas semejantes a otras que rodean al Golgi.

Se ha seguido el transporte intracelular por medio de precursores radiactivos (por ejemplo: leucina- ^3H) inyectados en el animal o aplicados a los cortes de tejido. En tiempos variables los tejidos se fijan y se procesan para la radioautografía.

La cinética del marcado de una proteína secretoria puede estudiarse mediante un pulso corto de administración seguido de la llamada persecución (*chase*). Por ejemplo, los cortes del páncreas son primero expuestos a un medio libre de leucina —es decir, una solución salina que contiene todos los aminoácidos menos leucina—, que produce un vaciamiento de la leucina endógena. Después de cierto período, se somete el tejido durante unos pocos minutos a un medio que contiene leucina- ^3H

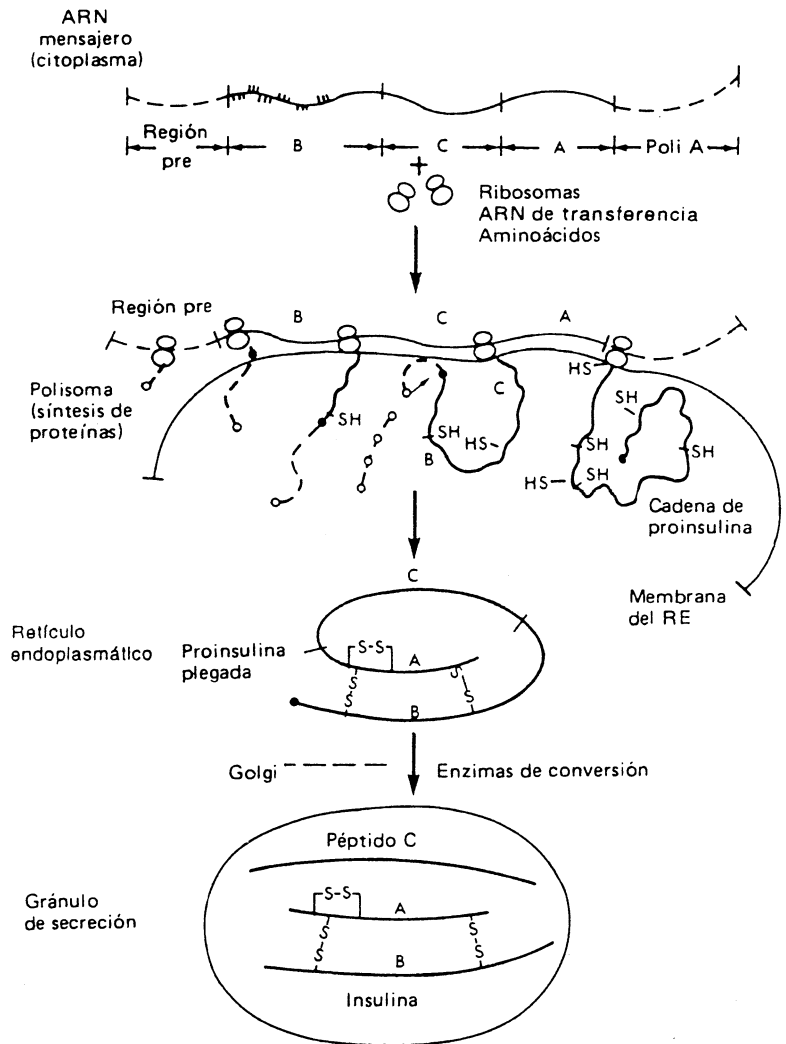


FIG. 8-22. Esquema que indica el procesamiento molecular de la secreción de insulina. Obsérvese que la región "pre" de la proinsulina se separa dentro del retículo endoplasmático. Las enzimas de conversión, presentes en el Golgi, transforman la proinsulina en insulina al eliminar el polipéptido C. (De S. J. Chan y D. F. Steiner [1977] *TIBS* 2:254.)

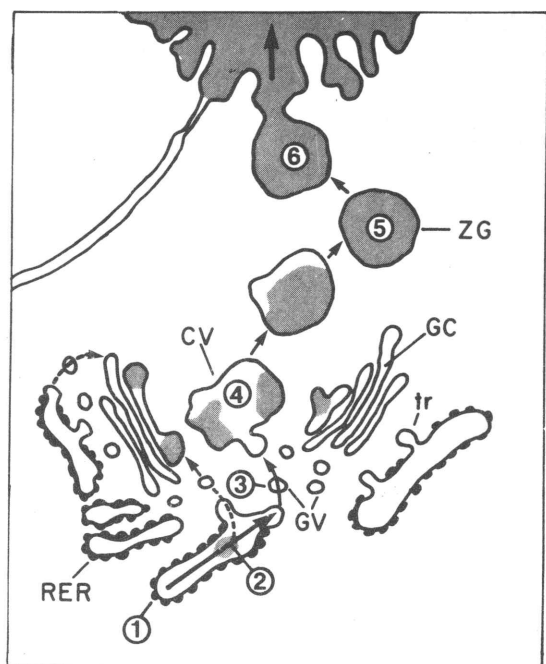


FIG. 8-23. Esquema del procesamiento de las proteínas secretoras en una célula glandular. Las etapas 1 a 6 se describen en el texto. RER, retículo endoplasmático rugoso; tr, vesículas de transición; GC, cisternas del Golgi; CV, vacuola condensante; ZG, gránulos de zimógeno. (Cortesía de J. D. Jamieson y G. E. Palade.)

y esto es seguido por la persecución, que consiste en un lavado y una incubación posterior en una solución que contiene leucina no marcada.

Una vez realizado el procedimiento radioautográfico, puede observarse que al cabo de unos pocos minutos el isótopo se localiza en el RER de la región basal y que luego la proteína recién sintetizada pasa hacia el complejo de Golgi y se concentra progresivamente en el interior de los gránulos de prezimógeno o vacuolas de condensación, rodeados de membrana. Después de un período más prolongado, la marca se encuentra principalmente en los gránulos de zimógeno y en la luz del ácino. Las micrografías electrónicas de las figuras 8-24 y 8-25 ilustran radioautográficamente la secuencia de estos fenómenos en cortes de páncreas.

La medición del número de gránulos radioautográficos ubicados sobre los distintos componentes celulares permite obtener datos cuantitativos. Inmediatamente después del pulso se produce un aumento brusco en la radiactividad del RE rugoso, que tiende a declinar con rapidez. La radiactividad se eleva luego en el complejo de Golgi, mientras que en los gránulos de secreción, maduros e inmaduros, aumenta con mayor lentitud. En el caso de la glándula parótida existe un movimiento ondulatorio de la proteína secretoria marcada por el pulso a

través de los distintos compartimientos intracelulares, que tiene el siguiente orden: RE rugoso → complejo de Golgi → gránulos inmaduros (vacuolas de condensación o prezimógeno) → gránulos de zimógeno maduros. Se calcula que la vida total de un gránulo de zimógeno en el páncreas de rata es de 52,4 minutos.

Con pocas variaciones, el transporte de la secreción del RE al Golgi es similar en todas las células productoras de proteínas.

4. Etapa de concentración de la proteína secretoria. Durante este período las vacuolas de condensación se convierten en gránulos de zimógeno por el aumento y la concentración progresivos de su contenido, que finalmente adquiere la opacidad electrónica característica. Esta conversión no depende de la provisión de energía metabólica, ya que prosigue aun después de la inhibición de la glucólisis o de la respiración.

Estas observaciones no permiten explicar el mecanismo por el cual se condensa la proteína secretoria. Sin embargo, se ha descubierto que en estas estructuras hay un polianión que interactúa con las proteínas secretorias básicas, lo que daría como resultado la formación de agregados inactivos desde el punto de vista osmótico, con la consiguiente pérdida pasiva de agua desde el gránulo de secreción al medio relativamente hiperosmótico del citosol.

5. Etapa de acumulación intracelular. La etapa anterior termina con la acumulación del producto secretorio en los gránulos de secreción, los que serán luego liberados cuando un estímulo apropiado actúe sobre la célula (hormona, neurotransmisor o fármaco).

6. Etapa de exocitosis. La descarga de los gránulos de secreción se efectúa por el proceso de exocitosis, que comprende su movimiento hacia la región apical de la célula y la fusión entre sus membranas y la membrana plasmática apical. Como resultado de esta fusión y de la correspondiente fisión, con eliminación de las capas interpuestas, se forma un orificio por el cual se descarga el producto de secreción (fig. 8-21, A).

El mecanismo de exocitosis fue descrito por primera vez en la médula suprarrenal después de la estimulación eléctrica del nervio esplácnico. Como se observa en la figura 8-26, los gránulos o vesículas con catecolaminas se adhieren primero a la membrana plasmática, luego se hinchan y finalmente evacúan su contenido y dejan las membranas vacías. La exocitosis requiere Ca^{2+} y la producción de ATP. Por lo tanto, se trata de un proceso que requiere energía. Posiblemente la energía sea consumida, al menos en parte, en la propulsión del gránulo hacia la zona apical de la célula (véase transporte microtubular, cap. 5-14).

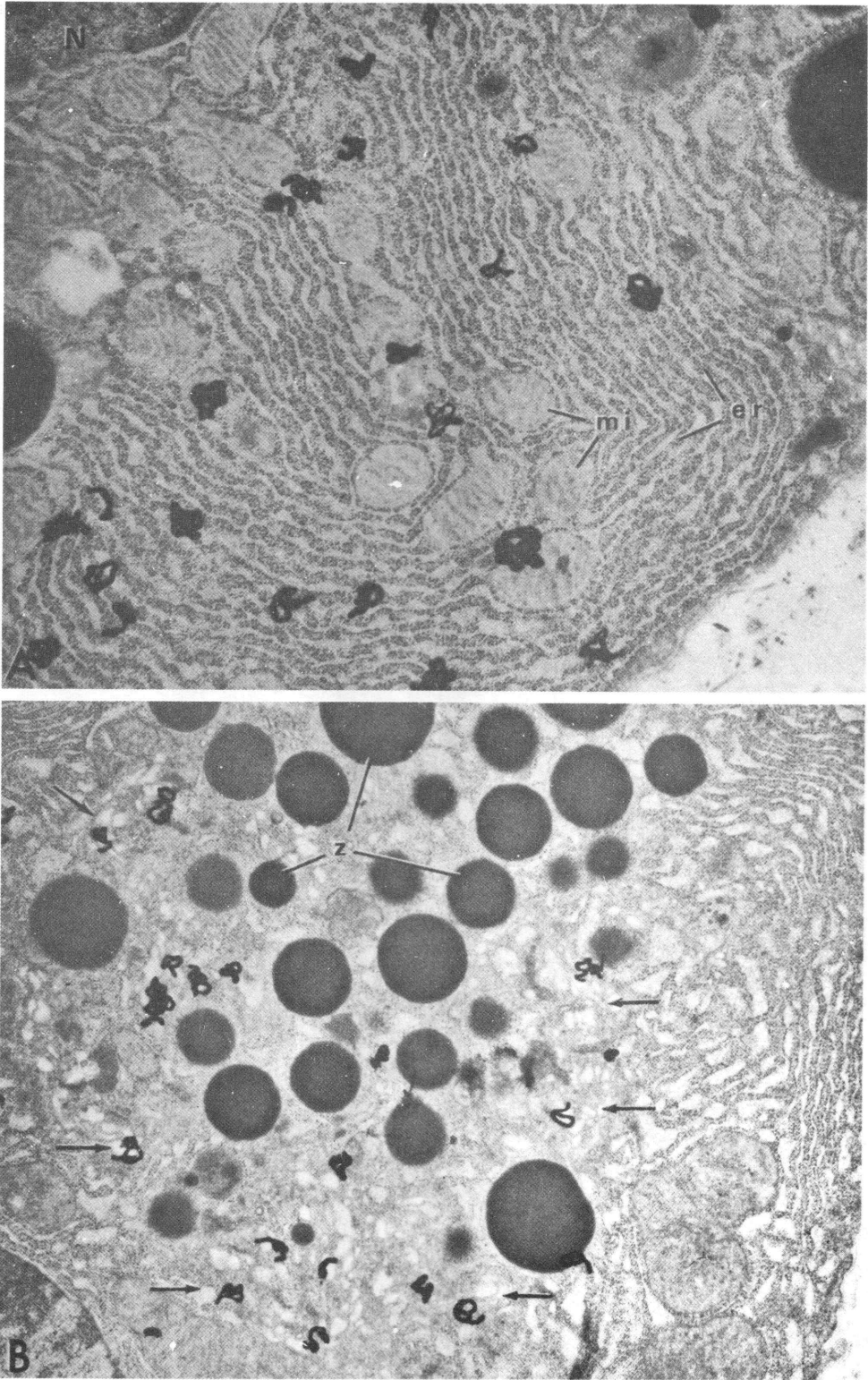


FIG. 8-24. Micrografías electrónicas de una radioautografía de células pancreáticas del cobayo. **A.** Tres minutos después del marcado con leucina- ^3H , los granos fotográficos se hallan exclusivamente en el retículo granular (er). mi, mitocondria; N, núcleo. 17.000 $\times$. **B.** Siete minutos después, la radiactividad se encuentra ahora en el complejo de Golgi (flechas). z, gránulos de zimógeno. 17.000 $\times$. (Cortesía de J. D. Jamieson y G. E. Palade.)

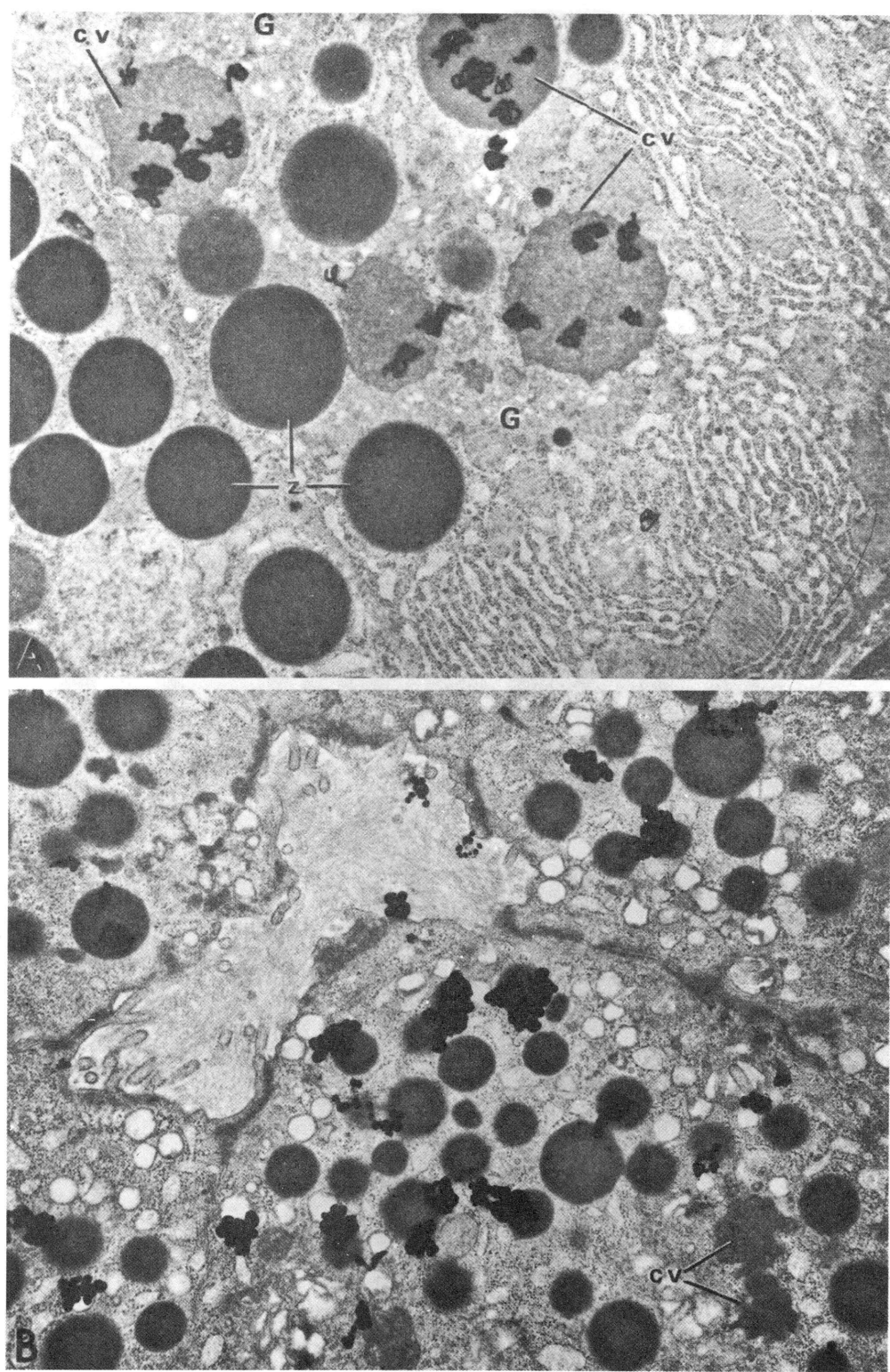


FIG. 8-25. A. Lo mismo que en la figura 8-24, pero 37 minutos después del marcado con leucina-³H. Los granos se hallan en las vacuolas condensantes (cv) del complejo de Golgi (G). Los gránulos de zimógeno no se marcan (z). 13.000×. **B.** Lo mismo 117 minutos después. Los granos fotográficos se localizan en los gránulos de zimógeno; algunos se hallan en la luz del ácino. 13.000×. (Cortesía de J. D. Jamieson y G. E. Palade.)

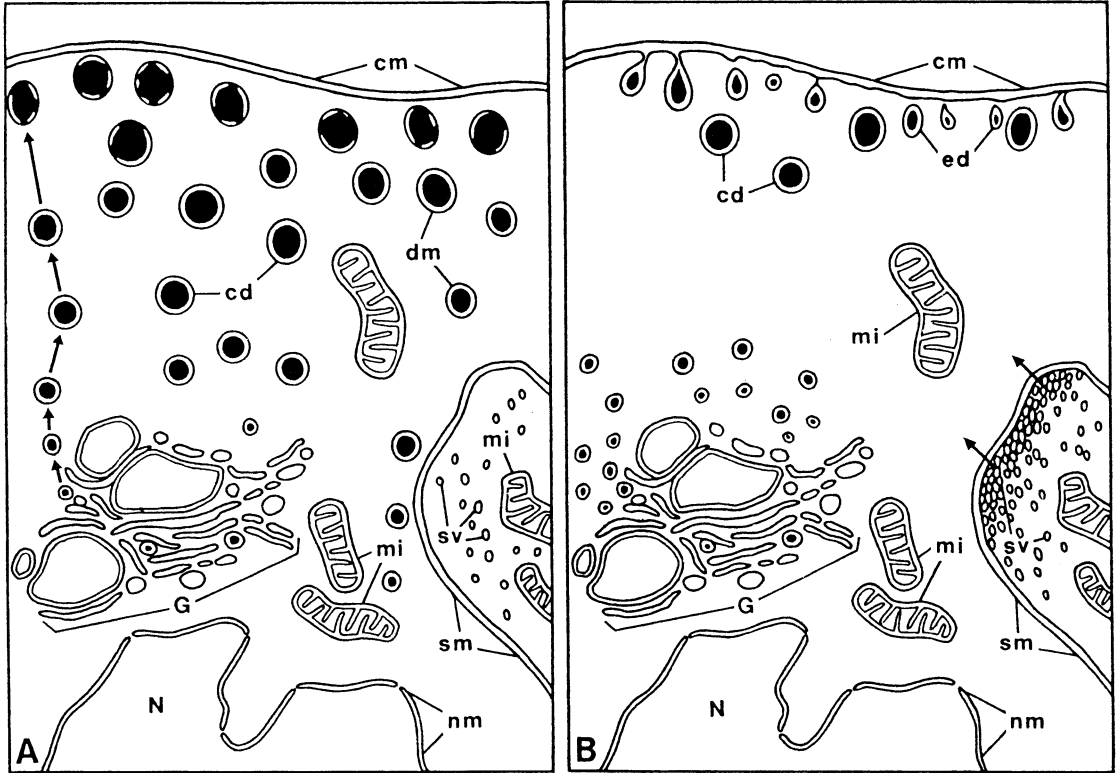


FIG. 8-26. Interpretación esquemática del mecanismo de la secreción en la célula cromafín. **A.** Célula en reposo en la cual los gránulos de catecolamina se han acumulado en el citoplasma externo. Cerca del núcleo, dentro del complejo de Golgi, una nueva secreción se va formando lentamente. A la derecha, porción de la terminación nerviosa con vesículas sinápticas (sv) y mitocondrias (mi). cm, membrana celular; cd, gránulos de catecolamina; dm, membranas de los gránulos; G, complejo de Golgi; N, núcleo; nm, membrana nuclear; sm, membrana sináptica. **B.** Célula cromafín después de una fuerte estimulación eléctrica del nervio esplácnico. Los gránulos de catecolamina casi han desaparecido y los pocos que quedan se ven en diferentes estadios de excreción en el espacio intercelular. La región del Golgi forma nuevos gránulos rápidamente. En la terminación nerviosa se evidencia un aumento de las vesículas sinápticas con acumulación de los "puntos activos" sobre la membrana sináptica. (De E. De Robertis y D. Sabatini.)

El proceso de exocitosis en la suprarrenal comprende la presencia de una proteína denominada sinexina, de 47 kDa, que podría regular los fenómenos moleculares dependientes del Ca^{2+} que intervienen en la fusión de la membrana y la liberación de catecolaminas.

En la glándula parótida estimulada por drogas adrenérgicas, que actúan sobre receptores β , los gránulos de zimógeno se descargan por exocitosis en secuencia, es decir, en el orden que ocupan en la región apical. Se ha considerado que en el proceso de exocitosis interviene el AMP cíclico, ya que puede ser inducida con dibutilil AMP cíclico.

8-31. Endocitosis y reciclaje de las membranas de los gránulos secretorios

Una célula pancreática en la que se ha inhibido la síntesis de proteínas puede atravesar un ciclo completo de transporte, concentración, almacena-

miento y liberación. Esto sugiere que dentro del período de un ciclo (es decir, 60-90 minutos) no se requiere la síntesis de nuevas proteínas para las membranas que contienen la secreción. Dicho de otra manera, las membranas intracelulares tienen una vida mucho más larga y son utilizadas varias veces durante el proceso de secreción.

La membrana de los gránulos de zimógeno puede ser considerada como una vacuola que hace las veces de transportador entre el Golgi y la superficie celular.

El mecanismo que permite la remoción del exceso de membrana en la región apical de la célula estriba en la invaginación de segmentos de membrana a nivel de la superficie celular, los que vuelven como pequeñas vesículas hacia la región del Golgi para ser utilizados otra vez en la envoltura de nuevo material de secreción. En consecuencia, el proceso de exocitosis está acoplado con el de endocitosis.

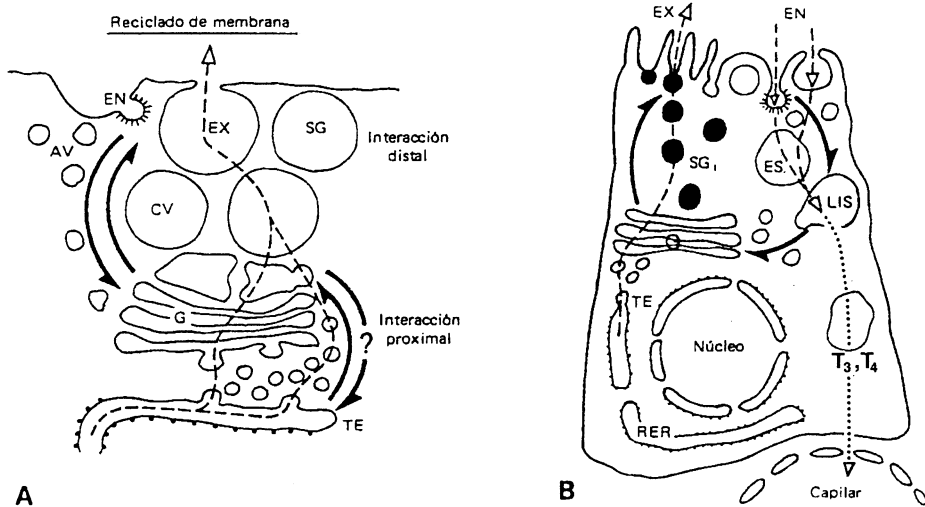


FIG. 8-27. Dibujos que ilustran los posibles mecanismos de recuperación de la membrana luego de la exocitosis del gránulo secretor (SG). En **A**, que corresponde a una célula exocrina, se muestran dos interacciones de membrana. Una proximal representa la fusión de elementos transicionales (TE) del RE que son transferidos al complejo de Golgi (G). En la interacción distal de la membrana luego de la exocitosis (EX), se produce la endocitosis (EN) de trozos de membrana del SG por las vesículas con cubierta que luego, en forma de vesículas sin cubierta (AV), son transferidas nuevamente al complejo de Golgi. El signo de interrogación indica una vía todavía desconocida. En **B** la secreción de tiroglobulina de una célula de la tiroides es llevada desde el RE rugoso por medio de los TE hasta el Golgi, donde se forman SG que luego son secretados. La tiroglobulina más tarde es endocitada y pasa a los lisosomas (LIS) donde es hidrolizada, y las hormonas tiroideas triyodotironina (T₃) y tiroxina (T₄) difunden por la membrana laterobasal hacia el capilar. (Cortesía de V. Herzog.)

La especificidad de este proceso de reciclaje parece depender de la formación de fositas y vesículas cubiertas de clatrina que separan regiones de la membrana plasmática por un mecanismo de endocitosis selectiva (véase más adelante). La figura 8-27 muestra en forma esquemática dos mecanismos, por los cuales las membranas de los gránulos de secreción son recicladas y recuperadas por endocitosis. En **A**, ilustrada por una célula glandular exocrina, son extraídas las membranas por endocitosis mediante vesículas con cubierta y, de este modo, son entregadas a la región del Golgi para volver a ser usadas en otro ciclo secretorio. En **B**, ilustrada por una célula endocrina de la glándula tiroides, las vesículas endocitóticas son internalizadas y transferidas a lisosomas.

LISOSOMAS

8-32. Los lisosomas son orgánoides membranosos que contienen hidrolasas ácidas

Todas las células eucarióticas contienen lisosomas, que son un grupo de orgánoides intracitoplasmáticos cuya función principal es la digestión de material intracelular o proveniente del exterior. Los lisosomas se distinguen de otros orgánoides por su morfología y por las funciones que desempeñan: 1) digieren alimentos y otros materiales incorpora-

dos por endocitosis; 2) digieren partes de las células por el proceso de autofagia; 3) digieren material extracelular por medio de enzimas que liberan en el medio circundante.

Veremos a continuación que los lisosomas contienen numerosas enzimas hidrolíticas que intervienen en los mecanismos de la digestión celular. Cuando alguna de estas enzimas está alterada genéticamente se producen importantes modificaciones de las funciones de las células y por eso destacamos el papel de los lisosomas en patología y medicina.

En la célula existe otro compartimiento, el *endosómico*, que se caracteriza por su contenido ácido y por su función en la separación intracelular selectiva de receptores y ligandos.

El lisosoma y el endosoma están relacionados de modo directo con el proceso de *endocitosis*, que comprende la *fagocitosis* y la *pinocitosis*, que luego analizaremos. La endocitosis es un mecanismo selectivo mediado por receptores, como los relacionados con procesos de tránsito y transferencia de membranas. En estos casos desempeñan un papel fundamental las vesículas con cubierta, revestidas por clatrina y por otras proteínas.

Características principales de los lisosomas

El concepto de lisosoma se originó a partir de la incorporación de técnicas de fraccionamiento celu-

lar mediante las cuales pudieron aislarse diversos componentes subcelulares. En 1949, De Duve aisló una clase de partículas que tenían propiedades de centrifugación intermedias entre las mitocondrias y los microsomas, y en las cuales se encontró un alto contenido de fosfatasa ácida y otras enzimas hidrolíticas. De ahí el nombre de lisosomas (del griego *lisis*, disolución, y *soma*, cuerpo). En la actualidad se reconocen unas 50 hidrolasas lisosómicas (tabla 8-6), las cuales pueden digerir la mayoría de las sustancias biológicas.

Se encuentran lisosomas tanto en las células animales como en las vegetales y en los protozoos. En las bacterias no hay lisosomas, pero el llamado espacio periplasmático, que se observa entre la membrana y la pared celular, puede desempeñar un papel similar al de los lisosomas. Una propiedad importante de los lisosomas es su estabilidad en la célula viva. Las enzimas están rodeadas por una membrana y, por lo tanto, no se hallan en contacto directo con el sustrato. Si se homogeneiza a la célula suavemente, la cantidad de enzimas que escapa de los lisosomas es escasa, pero ésta aumenta mucho si se trata a las partículas con soluciones hiposmóticas o agentes tensioactivos. Esta propiedad se denomina latencia de las enzimas lisosómicas. La membrana lisosómica posee una cubierta interna de oligosacáridos especiales y es resistente a las enzimas que contiene; todo el proceso de digestión intracelular se realiza dentro de los lisosomas. De esta forma se protege al resto de la célula del efecto destructivo de las enzimas, y su estabilidad reviste fundamental importancia para el funcionamiento normal de la célula. En ciertos casos patológicos, en los que la membrana del lisosoma se vuelve más lábil, se produce la salida de las enzimas hacia la matriz citoplasmática, con consecuencias catastróficas para la célula. Otra característica interesante es que las enzimas de los lisosomas actúan en medio ácido (el interior de los lisosomas tiene un pH cercano a 5).

8-33. Diversas técnicas citoquímicas ayudan a identificar a los lisosomas

En un principio, el concepto de lisosoma se fundó sobre bases bioquímicas, pero pronto se lo pudo identificar con el microscopio electrónico y con varias técnicas citoquímicas.

El procedimiento citoquímico más utilizado para colorear a los lisosomas es el de Gomori para *fosfatasa ácida* (cap. 3-22 y fig. 8-28). Los lisosomas pueden también detectarse por medio de reacciones para β -glucuronidasa, arilsulfatasa, N-acetil- β -glucosaminidasa y 5-bromo-4-cloroindolacetato esterasa. Es posible asimismo utilizar sustancias que son incorporadas en los lisosomas, por ejemplo, la

TABLA 8-6. Enzimas lisosómicas

Función	Enzima
Transferasas que transfieren grupos fosfóricos	
Nucleotidiltransferasas	Ribonucleasa
Hidrolasas que actúan sobre uniones éster	Esterasa Lipasa Fosfolipasas A ₁ y A ₂ Fosfatasa ácida (varios tipos) Fosfoproteína-fosfatasa Fosfodiesterasa (exonucleasa) Fosfolipasa C Desoxirribonucleasa II Arilsulfatasa A y B
Hidrolasas que actúan sobre compuestos glucósidos	Lisozima (muramidasa) Neuraminidasa α -Glucosidasa β -Glucosidasa α -Galactosidasa β -Glucuronidasa Hialuronidasa
Enzimas que actúan sobre uniones peptídicas (péptido hidrolasas)	Carboxipeptidasa Cathepsina A Carboxipeptidasa ácida Dipeptidasa Cathepsina B ₁ y B ₂ Cathepsina C Cathepsina D Cathepsina E Renina Colagenasa Activador del plasminógeno
Enzimas que actúan sobre la unión anhídrido-ácido en anhídridos que contienen fosforilo	Pirofosfatasa Arilfosfatasa
Enzimas que actúan sobre las uniones P-N	Fosfamidasa

peroxidasa. Ciertas sustancias se acumulan en los lisosomas y éstos pueden ser identificados luego por microscopia de fluorescencia o de campo claro. Así, el rojo neutro, algunas drogas antimaláricas y la vitamina A (que son fluorescentes) y la peroxidasa (que puede ser revelada con la bencidina) son captados por los lisosomas.

Hemos visto que los lisosomas representan un compartimiento de contenido ácido y más adelante veremos que también los endosomas tienen un pH ácido, aunque carecen de enzimas hidrolíticas. Por medio de la incorporación en la célula de marcadores coloreados de pH, como un complejo de dextrano con fluoresceína, es posible determinar que el pH intralisosómico es de alrededor de 5. La acidificación de los endosomas y lisosomas se debe a una bomba protónica que consume ATP y que se encuentra en la membrana del organoide. Es interesante recordar que ciertas aminas, como la

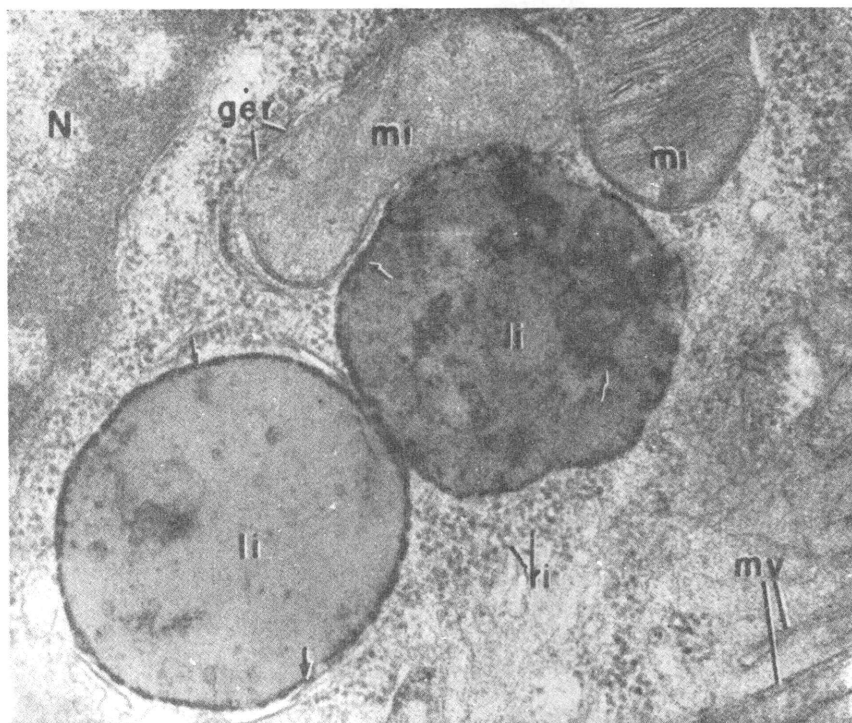


FIG. 8-28. Micrografía electrónica del túbulo proximal del riñón de ratón, dos horas después de la inyección de hemoglobina de buey. Se han formado en la región apical dos gotas de absorción (fagosoma o lisosoma) y la reacción de la fosfatasa ácida se hace positiva primero en la superficie (flecha) y luego en el interior del lisosoma. N, núcleo; ger, retículo endoplasmático granular; ri, ribosoma; mv, microvellosidad; li, lisosoma. 60.000X. (Cortesía de F. Miller.)

droga antimalárica cloroquina, se acumulan en los lisosomas. Por ser bases débiles, estas drogas reaccionan con el contenido ácido de los organoides y aumentan el pH. Esto ocasiona la entrada de agua y la vacuolización del lisosoma con pérdida de enzimas.

8-34. Los lisosomas son muy polimorfos

La característica más notable de los lisosomas es su polimorfismo, sobre todo en lo que respecta al tamaño y a la irregularidad de su estructura interna (fig. 1-15). Este polimorfismo, que sugiere el dinamismo de estos organoides, puede verse después del aislamiento de los lisosomas por fraccionamiento celular (fig. 8-29).

Dentro de la célula los lisosomas están relacionados con cuerpos multivesiculares, vesículas con cubierta y lisas y cuerpos densos; las imágenes observadas sugieren la posibilidad de que se produzcan fenómenos de fusión y de fisión entre estas estructuras.

De acuerdo con la interpretación corriente, el polimorfismo de los lisosomas proviene de la asociación de los lisosomas primarios con diferentes materiales fagocitados por la célula. La figura 8-30 resume estos conceptos.

8-35. Se distinguen los lisosomas primarios y tres tipos de lisosomas secundarios

Se han reconocido cuatro tipos de lisosomas, de los cuales uno es el *lisosoma primario*; los otros tres pueden designarse en conjunto como *lisosomas secundarios*.

1. **Lisosoma primario.** Representa un pequeño cuerpo cuyo contenido enzimático es sintetizado por los ribosomas y acumulado en el retículo endoplasmático. Desde allí las enzimas penetran en la región del Golgi, donde se observa la primera reacción de la fosfatasa ácida (fig. 8-31). El lisosoma primario contendría sólo parte de las enzimas, y únicamente tras la fusión con el endosoma tardío (véase más adelante) se completaría la dotación de hidrolasas ácidas. El proceso de formación de lisosomas primarios puede seguirse en cultivos de monocitos, que en presencia de proteínas séricas se transforman en macrófagos. En un período breve hay una considerable síntesis de enzimas hidrolíticas, susceptible de ser bloqueada por la puomicina, un inhibidor de la síntesis proteica. En estas células activadas, usando leucina-³H y radioautografía, se observó el siguiente orden en la transferencia de proteínas: retículo endoplasmático → complejo de Golgi → lisosomas.

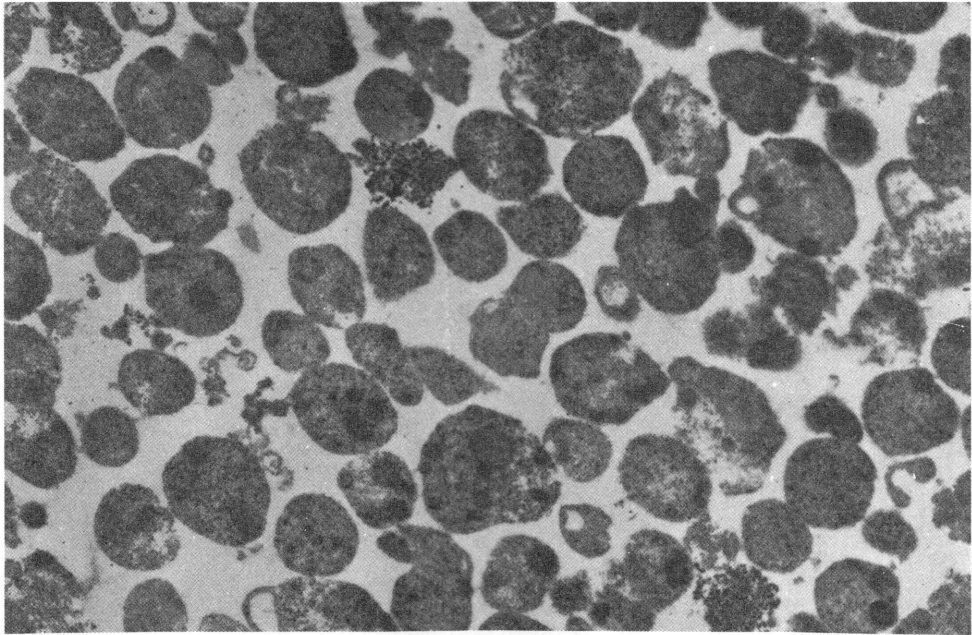


FIG. 8-29. Lisosomas aislados por centrifugación diferencial del hígado de la rata. Se observan partículas muy densas y una variedad de materiales densos contenidos dentro de la única membrana del lisosoma. 60.000 $\times$. (Cortesía de C. de Duve.)

2. **Heterofagosoma o vacuola digestiva.** Aparece después de la fagocitosis o pinocitosis de material extraño. Este cuerpo contiene el material ingerido dentro de una membrana y evidencia una reacción de fosfatasa positiva, que puede deberse a la fusión con un lisosoma primario (fig. 8-30).

El material englobado es progresivamente digerido por las enzimas hidrolíticas que se han incorporado en el lisosoma. En condiciones ideales, la digestión da como resultado productos de pequeño peso molecular que pueden atravesar la membrana lisosómica y ser incorporados a la célula para su nueva utilización en distintos ciclos metabólicos.

3. **Cuerpos residuales.** Resultan de una digestión incompleta. En algunas células, como en la ameba y diversos protozoos, son eliminados por medio de la defecación (fig. 8-30). En cambio, en otras células permanecen durante largo tiempo y pueden ocupar una buena parte del citoplasma. Por ejemplo, las inclusiones de pigmentos de tipo *lipofusina* (cap. 5-5) que se encuentran en neuronas, cardiocitos y otras células de organismos viejos son el resultado de este tipo de proceso.

4. **Vacuola autofágica o citolisosoma (autofagosoma).** Es un caso especial en el cual el lisosoma contiene partes celulares en vías de digestión

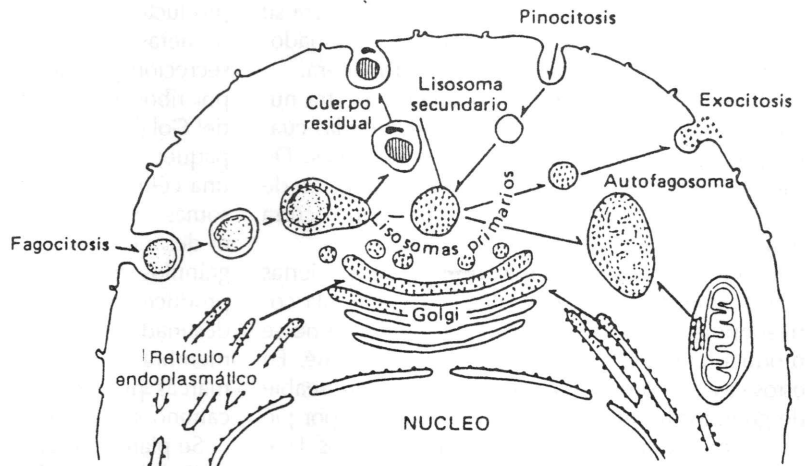


FIG. 8-30. Esquema de los aspectos dinámicos del sistema lisosómico. Obsérvense las relaciones entre los procesos de fagocitosis, pinocitosis, exocitosis y autofagia.

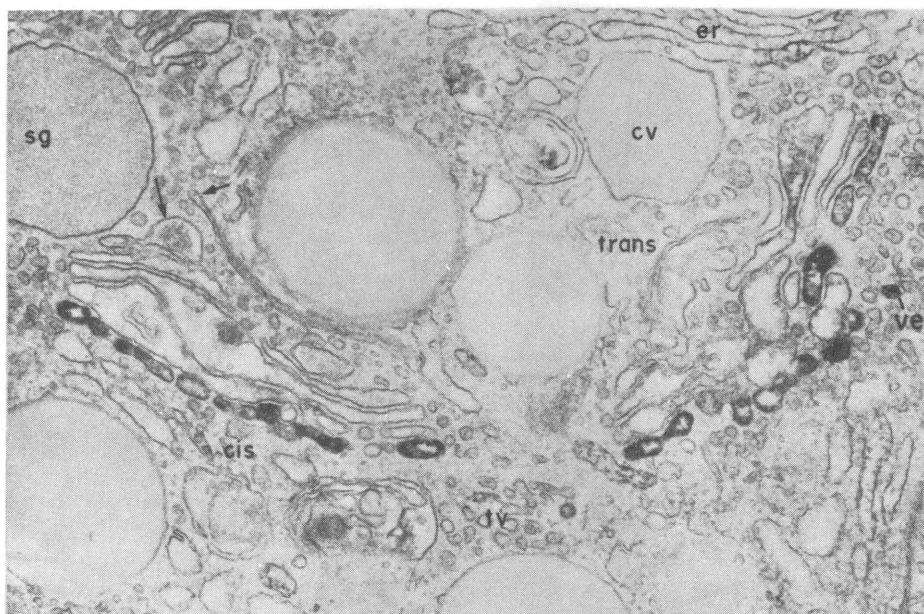


FIG. 8-31. Micrografía electrónica de una célula de ácino pancreático que muestra la localización del receptor de manosa 6-fosfato mediante el uso de anticuerpos. Obsérvese la neta polarización del complejo de Golgi evidenciada por la localización de la reacción inmunológica estrictamente en las cisternas del lado cis del complejo, mientras que ésta falta en la región trans. Algunas pocas vesículas (ve) dan también positiva la reacción. tv, vesículas transportadoras; cv, vesículas condensantes; sg, gránulos de secreción; er, retículo endoplasmático. (Cortesía de M. G. Farquhar.)

(fig. 8-30). Los lisosomas regularmente engloban partículas de citosol y su contenido es degradado por un mecanismo denominado microautofagia.

La autofagia es una propiedad general de la célula eucariótica. Muchos de los componentes celulares, como las mitocondrias, se renuevan por intermedio de los lisosomas. Los organoides citoplasmáticos se rodean de una membrana de RE liso y luego se descargan en estas vacuolas las enzimas lisosómicas que destruyen su contenido.

Ciertas proteínas citoplasmáticas tienen señales especiales (denominadas *secuencias KFERQ*) que hacen que sean captadas por los lisosomas para su digestión. Se supone que los organoides destinados a ser destruidos son marcados de esta manera.

Durante la inanición, el hepatocito muestra numerosas vacuolas autofágicas en alguna de las cuales pueden encontrarse restos mitocondriales. De este modo la célula puede lograr la degradación de algunos de sus propios componentes sin que ocurra daño irreparable.

En los procesos de secreción regulada de ciertas células endocrinas (véase antes), si la glándula correspondiente no es estimulada, la secreción no se produce aunque la síntesis hormonal continúe. En estos casos se produciría una sobrecarga indeseable de gránulos hormonales, lo que no sucede porque éstos son destruidos selectivamente por los lisosomas en un proceso denominado *crinofagia*.

En la disminución de tamaño celular que se ve normalmente en algunos tejidos en etapas fisiológicas de involución —por ejemplo, en los miocitos del útero luego del parto— éste es el mecanismo corriente de reabsorción de masa celular.

8-36. Las enzimas lisosómicas se sintetizan en el RE y se seleccionan y segregan en el aparato de Golgi: el receptor de manosa 6-fosfato (Man6P)

Se considera que los lisosomas primarios son productos de la actividad celular semejantes en sus primeras etapas de formación a los gránulos de secreción proteica. Vale decir que son sintetizados por ribosomas, entran en el RE y llegan a la región del Golgi para su maduración, concentración y empaquetamiento final. Por medio de este mecanismo una célula puede producir diferentes tipos de lisosomas y muchos otros productos de secreción, pero el destino de los lisosomas es diferente del de los gránulos de secreción. En el complejo de Golgi se produce no solamente la selección de las proteínas destinadas a los lisosomas, sino que se provee a las membranas en las que serán empaquetadas de las marcas proteicas necesarias para que no sigan el camino secretorio.

Se plantea aquí el problema de cómo el aparato de Golgi dirige selectivamente hacia el lisosoma las

enzimas prelisosómicas de entre las miles de proteínas que abarrotan sus cisternas.

El mecanismo de separación reside en la presencia de residuos terminales de *manosa 6-fosfato* (Man6P) en los oligosacáridos de las enzimas lisosómicas, que interactúan luego con receptores especiales en las membranas del complejo de Golgi.

Una proteína destinada a los lisosomas es secretada en la luz del RER, donde es glucosilada. Luego se produce la transferencia al retículo cis-Golgi, donde al parecer tiene lugar la fosforilación de la manosa para formar Man6P, reacción catalizada por las enzimas N-acetilglucosamina 1-fosfotransferasa y N-acetilglucosamilfosfodiesterasa.

Las proteínas lisosómicas fosforiladas en manosa se unen a un receptor proteico unido a las membranas del Golgi (el *receptor de Man6P*), y son luego transportadas por el mecanismo habitual de vesículas transportadoras a través de los compartimientos medial y cis (en los que no sufren mayores cambios) hasta llegar a la región del retículo trans-Golgi. Tras haber arribado a su destino final el residuo Man6P es separado por hidrólisis.

Recientemente se estudió la localización del receptor de Man6P con métodos inmunohistoquímicos (fig. 8-31). Se observó que estos receptores se concentraban en el lado cis del complejo de Golgi, así como en vesículas con cubierta, endosomas y lisosomas. Todas estas estructuras pueden considerarse estaciones en la ruta que siguen las enzimas lisosómicas.

Este mecanismo de transporte mediante el receptor de Man6P permite explicar los casos de las llamadas "*enfermedades I*", en las cuales las enzimas lisosómicas son secretadas al exterior celular en cantidades masivas. En estos casos existe deficiencia en la biosíntesis del residuo Man6P, de modo que no hay interacción con el receptor y su transporte es anormal, ya que las proteínas lisosómicas son interpretadas por el aparato de Golgi como destinadas a la secreción.

Alteraciones semejantes se producen en células cultivadas que son deficientes en el receptor de Man6P y también en células tratadas con tunicamicina, droga que impide la glucosidación de las enzimas lisosómicas. La administración de ciertas aminas, como la cloroquina, también provoca la secreción de grandes cantidades de enzimas lisosómicas.

8-37. La función general de los lisosomas es la digestión intracelular

Hemos dicho que la función principal de los lisosomas es la destrucción enzimática intracelular de sustancias. Los materiales ingeridos, así como los que provienen de la autofagia, son sometidos a la acción de las diversas hidrolasas lisosómicas (tabla

8-6). La mayoría de estas enzimas tienen un pH óptimo ácido y, en efecto, el interior del lisosoma es ácido (pH alrededor de 5,0).

La digestión de las proteínas llega generalmente hasta el estado de dipéptido, que puede atravesar la membrana lisosómica y es degradado en el citosol a aminoácidos. Los hidratos de carbono se hidrolizan hasta monosacáridos y son fácilmente liberados del lisosoma; sin embargo, algunos disacáridos y polisacáridos (celobiosa, inulina o dextrano) no se digieren y permanecen dentro del lisosoma. Por ejemplo, la sacarosa, captada mediante pinocitosis por macrófagos, no es hidrolizada y permanece en el interior de los lisosomas secundarios, que se hinchan por el aumento de la presión osmótica y hacen que la célula se vuelva vacuolada. Estas vacuolas corresponden a los lisosomas sobrecargados de sacarosa. Si se administra entonces la enzima sacarasa, ésta penetra en los lisosomas y se restablece la normalidad. Esta experiencia sugiere un camino para el tratamiento de ciertas enfermedades lisosómicas (véase más adelante).

8-38. La renovación de células y de material extracelular por los lisosomas es importante en muchos procesos del desarrollo

Muchos de los procesos del desarrollo comprenden la descamación y remodelación de tejidos con pérdida de células enteras y de material extracelular. En la metamorfosis de los anfibios se produce una considerable muerte celular (apoptosis) con destrucción posterior de las células, que es llevada a cabo por medio de los lisosomas. Así, la pérdida de la cola de los renacuajos es ocasionada por apoptosis seguida de la acción de catepsinas (enzimas proteolíticas) contenidas en los lisosomas.

En órganos que sufren regresión, como los conductos de Wolff en el embrión hembra y los de Müller en el macho, hay una acentuada actividad de las enzimas lisosómicas tras la muerte celular. En otros tejidos la regresión sigue a un período de actividad; por ejemplo, el útero humano en el momento del parto pesa 2 kg y luego, en pocos días, se reduce al peso normal de 70 g. Durante esta fase de regresión hay una gran infiltración de células fagocíticas cuyos lisosomas digieren los restos de la mucosa, el material extracelular y parte del endometrio. La autofagia se produce también en grado notable en la glándula mamaria después de la lactancia.

8-39. Las enzimas lisosómicas pueden ser liberadas y actuar sobre el material extracelular

Mencionamos antes que el contenido de los lisosomas primarios puede ser liberado hacia el medio

extracelular por un proceso de exocitosis semejante a la secreción (fig. 8-30). Así, los osteoclastos son capaces de remover el hueso mediante la liberación de enzimas lisosómicas que degradan la matriz orgánica. Este proceso es activado por la parathormona. También la vitamina A, en hueso cultivado, activa a las enzimas lisosómicas. Por intoxicación con vitamina A se producen fracturas espontáneas en animales. Las enzimas lisosómicas también son liberadas por anticuerpos anticelulares en presencia de complemento. Este mecanismo se produce en la artritis reumatoidea, una enfermedad en la cual los cartílagos de las articulaciones son erosionados por lisosomas.

La liberación de enzimas lisosómicas aumenta con la citocalasina B y se reduce con la cloroquina.

8-40. Las enzimas lisosómicas intervienen en la liberación de la hormona tiroidea y en la crinofagia en muchas células glandulares

Las hormonas tiroideas (tiroxina y triyodotironina) se liberan a partir de una molécula de proteína —la tiroglobulina— que se acumula en el coloide de los folículos. En 1941, De Robertis observó que esta liberación se debía a la activación de una enzima proteolítica. Se sabe ahora que en ese mecanismo enzimático intervienen procesos de fagocitosis del coloide seguidos de digestión de los fagolisosomas por las proteasas lisosómicas. Dos de los productos de la digestión enzimática del coloide son la T₃ y la T₄, que difunden fuera del lisosoma y de la célula para pasar a la circulación.

Ya analizamos anteriormente que la denominación de crinofagia se ha aplicado al mecanismo por el cual se pueden remover gránulos de secreción producidos en exceso de las necesidades fisiológicas. Este es un caso especial de autofagia que fue

observado por primera vez en la hipófisis, pero que posiblemente actúe en muchas glándulas exocrinas y endocrinas.

8-41. Algunos gránulos de los leucocitos son de naturaleza lisosómica

Todos los leucocitos de los vertebrados contienen gránulos de naturaleza lisosómica. En los diversos leucocitos hay varios tipos de gránulos, demostrables con el microscopio electrónico y separables por centrifugación, parte de los cuales contienen diversas enzimas lisosómicas. Los monocitos tienen pocos lisosomas, pero al entrar en los tejidos se transforman en macrófagos que los contienen en abundancia.

8-42. Los lisosomas son importantes en las células germinales y en la fertilización

El acrosoma del espermatozoide, que se desarrolla en el aparato de Golgi y cubre el extremo anterior del núcleo, puede considerarse un lisosoma especial. Contiene proteasa, hialuronidasa —enzima que digiere las cubiertas de ácido hialurónico— y abundante fosfatasa ácida. Durante la fecundación del ovocito, la hialuronidasa dispersa las células situadas alrededor del ovocito (*cumulus oöphorus*) y la proteasa digiere la zona pelúcida en el sitio donde penetrará el espermatozoide. En los huevos, los lisosomas intervienen en la digestión de las sustancias de reserva.

8-43. Los lisosomas participan en muchas enfermedades y síndromes en el hombre

Los lisosomas tienen una importancia particular en medicina, ya que están involucrados en muchas

TABLA 8-7. Algunas enfermedades producidas por la falta de enzimas lisosómicas
(de Allison (1974))

<i>Enfermedad</i>	<i>Polisacárido o esfingolípido que se acumula</i>	<i>Defecto enzimático</i>
Glucogenosis tipo II (enfermedad de Pompe)	Glucógeno	α-Glucosidasa
Enfermedad de Gaucher	Glucocerebrósido	β-Glucosidasa
Enfermedad de Niemann-Pick	Esfingomielina	Esfingomielinasa
Enfermedad de Krabbe	Galactocerebrósido	β-Galactosidasa
Leucodistrofia metacromática	Sulfátido	Sulfatidasa
Enfermedad de Fabry	Trihexósido de ceramida	α-Galactosidasa
Enfermedad de Tay-Sachs	Gangliósido GM ₂	Hexosaminidasa
Variante de Tay-Sachs	Globósido (+ gangliósido GM ₂)	Hexosaminidasas totales
Gangliosidosis generalizada	Gangliósido GM ₁	β-Galactosidasa

enfermedades y síndromes. En ciertos estados patológicos, como en la artritis reumatoidea antes mencionada, la silicosis y la asbestosis (afecciones producidas por la inhalación de partículas de sílice o de amianto) y en la gota (en la cual se acumula ácido úrico en las articulaciones) se produce la liberación de enzimas lisosómicas a partir de los macrófagos, las que ocasionan una inflamación aguda de los tejidos. Esta puede llevar a la fibrosis (aumento de la síntesis de colágeno). La liberación de enzimas lisosómicas también ocurre en estados de anoxia, acidosis y shock, y se las encuentra aumentadas en la sangre. Un caso común es el del infarto de miocardio.

Es importante recordar que la membrana del lisosoma puede ser labilizada por muchas sustancias. Todas las vitaminas liposolubles (A, K, D y E) así como las hormonas sexuales esteroideas tienden a hacer más lábil la membrana del lisosoma. En cambio, la cortisona, la hidrocortisona y las drogas antiinflamatorias no esteroideas tienden a darle estabilidad.

Los lisosomas de los leucocitos y macrófagos intervienen en la defensa del organismo contra las bacterias y los virus. Sin embargo, en casos como el de la tuberculosis y la lepra las bacterias son resistentes —por la presencia de componentes especiales de la pared celular— y sobreviven dentro de los macrófagos. Lo mismo sucede en ciertas parasitosis y micosis (por ejemplo, en la toxoplasmosis).

8-44. Las enfermedades por acumulación (tesaurismosis) se deben a mutaciones que afectan a las enzimas lisosómicas

Hay varias enfermedades congénitas en las que la principal alteración comprende la acumulación intracelular de sustancias, como glucógeno y glucolípidos. Se trata de las enfermedades por acumulación, producidas por una mutación que afecta a una de las enzimas lisosómicas involucradas en el catabolismo de una sustancia determinada. Por ejemplo, en la glucogenosis tipo II, el hígado y el músculo aparecen ocupados por glucógeno dentro de los organoides rodeados por membrana. En este caso falta la α -glucosidasa, enzima que degrada el glucógeno a glucosa.

En la actualidad se conocen unas veinte enfermedades en las que tienen participación los lisosomas, y en la mayoría hay acumulación de glucolípidos y glucosaminoglucanos. En ellas falta una de las enzimas lisosómicas (β -glucosidasa, sulfatidasa, etc.) (tabla 8-7).

Muchas de las enfermedades por acumulación de glucoesfingolípidos afectan el cerebro, ya que estos lípidos abundan en la vaina de mielina (por

ejemplo, esto se ve en la enfermedad de Tay-Sachs, en la de Niemann-Pick, etc.). En estos pacientes la síntesis de los esfingolípidos es normal, pero luego, como no son degradados, se acumulan en los lisosomas.

8-45. Las células vegetales tienen lisosomas que intervienen en la germinación de las semillas

En las células vegetales se han identificado también organoides que contienen enzimas digestivas. En los embriones de la semilla de maíz las grandes células parenquimatosas vacuoladas contienen diversas enzimas lisosómicas (proteasa, carboxipeptidasa, ADNasa, ARNasa, β -amilasa, α -glucosidasa, etc.). En el capítulo 19 mencionaremos los cuerpos de aleurona (proteína) y los gránulos de almidón que se hallan en las semillas, y los cambios que éstos sufren durante la germinación. Tales cambios se producen por la salida de varias enzimas lisosómicas (como la α -amilasa), las cuales hidrolizan el material acumulado que ha de utilizar la planta en crecimiento. Por lo tanto, en los vegetales los lisosomas intervienen en la digestión celular y extracelular y también en los procesos de desarrollo.

ENDOCITOSIS: FAGOCITOSIS Y PINOCITOSIS

8-46. La endocitosis es el traslado en masa de materiales desde el exterior de la célula hacia el interior

El citoplasma de virtualmente todas las células contiene una multitud de estructuras membranosas vesiculares o vacuolares que se originan de desprendimientos de la membrana plasmática que son luego internalizados. Tales formaciones contienen material de origen extracelular que es internalizado en el citoplasma; así, los procesos que las originan se denominan en su conjunto *endocitosis*, la cual comprende dos mecanismos morfológica y funcionalmente diferentes: la *pinocitosis* y la *fagocitosis* (fig. 8-30).

Al analizar la secreción de proteínas por la célula se vio que la exocitosis es el proceso inverso, por el cual las vesículas o gránulos membranosos de secreción se dirigen hacia la superficie celular para fusionar sus membranas con la plasmática, abrirse hacia el exterior y volcar su contenido en el espacio extracelular; las membranas de las estructuras secretorias quedan incorporadas a la superficie celular, donde sus componentes difunden y se mezclan en el plano fluido de la bicapa o son reciclados por pinocitosis (fig. 8-27).

8-47. La fagocitosis es el proceso por el cual la célula extiende prolongaciones para incorporar material extracelular destinado a ser destruido por los lisosomas

La fagocitosis (del griego *phagein*, comer) se encuentra en gran número de protozoos y en ciertas células de metazoos, y en estos últimos constituye generalmente un medio de defensa contra partículas extrañas al organismo como bacterias, polvo atmosférico y diversos coloides.

La fagocitosis de sustancias extrañas se halla bien desarrollada sólo en dos células de los organismos superiores: los *leucocitos neutrófilos* de la sangre cuando pasan a los tejidos y las células de origen monocítico que suelen agruparse con la denominación genérica de *sistema monocítico-macrofágico* o macrofágico mononuclear. Las células que pertenecen a esta última categoría son los histiocitos del tejido conectivo, las células de la microglia del sistema nervioso, los osteoclastos del hueso, las células de von Kupffer del hígado y muchas otras que no son sino variantes con diferentes nombres del macrofago derivado del monocito.

Todas ellas son capaces de ingerir no sólo bacterias, protozoos y restos celulares, sino también partículas más pequeñas de naturaleza coloidal. En este caso el proceso recibe el nombre de ultrafagocitosis, aunque en realidad es una forma de pinocitosis.

Otros tipos celulares que en un tiempo fueron descriptos como fagocíticos, como diversos endotelios, no presentan en realidad fagocitosis ya que sólo captan material extracelular, del tipo de los colorantes vitales o coloides electronegativos, por medio de pinocitosis.

En los protozoos, la fagocitosis está íntimamente ligada al *movimiento ameboide* (cap. 5-30). Las amebas ingieren partículas voluminosas, incluso microorganismos, rodeándolas de pseudópodos hasta constituir una vacuola, dentro de la cual se produce la digestión del alimento.

Al analizar el proceso de fagocitosis se distinguen dos fenómenos distintos. El primero es la adhesión o adsorción de la partícula a la superficie externa de la membrana plasmática —en el que intervienen receptores específicos— y el segundo su penetración propiamente dicha en la célula, que incluye movimientos activos en los que participa el citoesqueleto de actina y sus proteínas asociadas (cap. 5-30).

En los fagocitos humanos, los dos receptores de membrana que median la fase de adhesión son dos proteínas transmembranosas: los *receptores C3* y *Fc*.

Se ha descripto un tipo de fagocitosis no mediada por receptores, con la formación de las llamadas *vacuolas parasitofóricas*.

En algunas ocasiones ha sido posible disociar las dos fases de la fagocitosis. Así, a baja temperatura, las bacterias pueden adherirse al citoplasma de los leucocitos sin ser ingeridas posteriormente.

Utilizando citocalasina B, droga que desorganiza los filamentos de actina, se observó que la fagocitosis también se inhibe, pero no la pinocitosis.

La fagocitosis es un mecanismo activo, en el sentido de que la célula utiliza energía para llevarla a cabo. Durante la fagocitosis por leucocitos se produce la llamada *explosión metabólica*, con aumento significativo del consumo de oxígeno, de la incorporación de glucosa y del desdoblamiento de glucógeno, con generación de anión superóxido, peróxidos y derivados halogenados que son germicidas. La inducción de la fagocitosis produce también un incremento de la síntesis de ácido fosfórico y de fosfatidilinositol.

Una vez en el interior de la célula, el fagosoma es desplazado por transporte microtubular hacia la región del Golgi, donde están los lisosomas primarios. Estos se fusionan con aquéllos, liberan su contenido y forman lisosomas secundarios (heterofagosomas) (fig. 8-30).

A diferencia de los procesos de pinocitosis que analizaremos a continuación, en la fagocitosis existe un mecanismo de movimientos activos de la zona cortical del citoplasma que se proyecta o extiende en íntima adhesión con la superficie del material extracelular que se termina incorporando. Los fagosomas resultantes suelen ser grandes, ya que contienen cuerpos de gran tamaño como bacterias, restos celulares y aun células nucleadas enteras, y son visualizados con el microscopio óptico. Invariablemente su contenido está destinado a ser digerido por fusión con los lisosomas.

8-48. La pinocitosis es el proceso por el cual la célula invagina porciones de la membrana plasmática para incorporar material extracelular

La incorporación de vesículas por la célula, observada primero por Edwards en la ameba y por Lewis en células cultivadas, fue denominada pinocitosis (del griego *pinein*, beber). Existen en realidad dos tipos de pinocitosis: a) la característica de los protozoos y de ciertas células cultivadas, conocida como *macropinocitosis*, que involucra vesículas de más de 0,2 μm llamadas *macropinosomas* —de hecho, este tipo de pinocitosis se observó hace más de 50 años con el microscopio óptico en células vivas—, y b) la que posee la casi totalidad de las células de los organismos superiores, denominada *micropinocitosis*, que obedece a un mecanismo diferente y no puede visualizarse con el microscopio óptico ya que sus *micropinosomas* o *vesículas de pinocitosis* miden 50 a 100 nm de diámetro.

1. **Macropinocitosis.** Trataremos primero la pinocitosis característica de los protozoos y de ciertas células cultivadas. En las películas de Lewis puede observarse que la pinocitosis se acompaña de movimientos citoplasmáticos vigorosos en el borde de la célula, como si las vesículas de líquido fueran rodeadas y englobadas por pliegues de la membrana. Estas vacuolas o macropinosomas son luego transportados en hilera hacia el interior de la célula, donde forman una especie de canales. Van disminuyendo de tamaño y haciéndose más densos a medida que se internalizan, lo cual sugiere que su contenido se va concentrando por pérdida de agua hacia el citosol. Finalmente los macropinosomas condensados se fusionan con lisosomas, como en el caso de la fagocitosis, y son digeridos.

Este tipo de pinocitosis se demuestra fácilmente por medio de proteínas marcadas con colorantes fluorescentes. La presencia de la proteína parece actuar como un estímulo para la pinocitosis. Su ingestión puede ser sorprendentemente elevada. El organismo unicelular prácticamente “bebe” la solución de proteína y junto con ella puede absorber otras sustancias que normalmente no penetran.

La pinocitosis puede ser inducida también por aminoácidos y por ciertos iones. En la ameba la actividad pinocítica, una vez que se inicia por acción de la sustancia inductora, persiste alrededor de 30 minutos, durante los cuales se forman unos cien canales fluidos. Después, el proceso se detiene y la ameba debe esperar dos o tres horas antes que comience otro ciclo pinocítico. Esto es interpretado como un indicio de que la superficie disponible de la membrana para la invaginación se agota en ese período.

Puede demostrarse que este tipo de pinocitosis —la macropinocitosis— y la fagocitosis son fenómenos esencialmente similares, si se permite que en primer término la ameba fagocite algunos protozoos ciliados para luego inducir la pinocitosis. En estas condiciones el número de canales de pinocitosis formados es mucho menor. Con el experimento inverso se comprueba que luego de macropinocitar, la ameba ingiere un número muy inferior de ciliados para alimentarse.

La macropinocitosis está relacionada con la cubierta celular que reviste a la membrana plasmática. Una proteína fluorescente puede concentrarse 50 veces en esta cubierta antes que la ameba la incorpore. La unión a la cubierta explica por qué la concentración de la proteína incorporada puede alcanzar cifras enormes.

2. **Micropinocitosis.** Es un mecanismo encontrado invariablemente en la casi totalidad de las células de los organismos superiores. En general, cuando se habla de pinocitosis sin especificar el tipo se hace referencia a esta modalidad ya que,

como vimos, la macropinocitosis es en realidad un tipo especial de fagocitosis en protozoos.

El empleo de la microscopia electrónica demuestra que la membrana plasmática de muchas células es susceptible de invaginarse para formar pequeñas vesículas de unos 50 a 100 nm. Esas vesículas fueron observadas por primera vez en células endoteliales de capilares, en las cuales se concentran en regiones adyacentes a las membranas interna y externa.

Se reconocen en general dos tipos de pinocitosis. La *pinocitosis de fase fluida o inespecífica* está representada principalmente por la pinocitosis de los endotelios y de otros pocos tipos celulares. Esta forma de pinocitosis parece captar líquido y solutos del exterior celular en forma no selectiva y los incluye en vesículas o pinosomas lisos. La formación de éstos comienza en áreas aparentemente no especializadas de la membrana plasmática, como una invaginación que se va profundizando hasta que el delgado cuello de la vesícula en formación se cierra y el pinosoma queda libre en el citosol (fig. 8-32). El mecanismo de invaginación de la membrana en la pinocitosis inespecífica no es claro.

En los endotelios existe una captación continua de plasma por este mecanismo, con transporte de las vesículas por el citoplasma hasta la cara opuesta de la célula, fusión con la membrana plasmática y exocitosis hacia el lado basal. Este pasaje transendotelial de líquidos se puede evidenciar mediante el empleo de trazadores opacos, como la peroxidasa. Este proceso, que representa una especie de tránsito de corta distancia que pasa por alto los compartimientos intracelulares y permite el pasaje de líquido a través de la célula, se denomina *transcitosis*.

La *pinocitosis adsorptiva, específica o mediada por receptores* es un proceso mucho más generalizado que el anterior, y sus mecanismos de producción son bien conocidos. Comprende la presencia de receptores transmembranosos para diversos ligandos extracelulares. Estos receptores se concentran en zonas o parches de la membrana, por dentro de las cuales se ve un material filamentosamente asociado. Luego de la unión con el ligando, estas áreas comienzan a invaginarse y forman las llamadas *fositas recubiertas*, para luego profundizarse y cerrarse como vimos anteriormente y dar origen a las *vesículas con cubierta o recubiertas*.

Se ha demostrado que los receptores transmembranosos poseen un dominio intracelular que se une a una proteína denominada *adaptina*, que media la adhesión de los receptores a otra proteína intracelular, la *clatrina*. El conjunto receptor-adaptina-clatrina es el que media la adhesión al ligando y genera las tensiones necesarias para deformar y plegar esa zona de la membrana, de modo

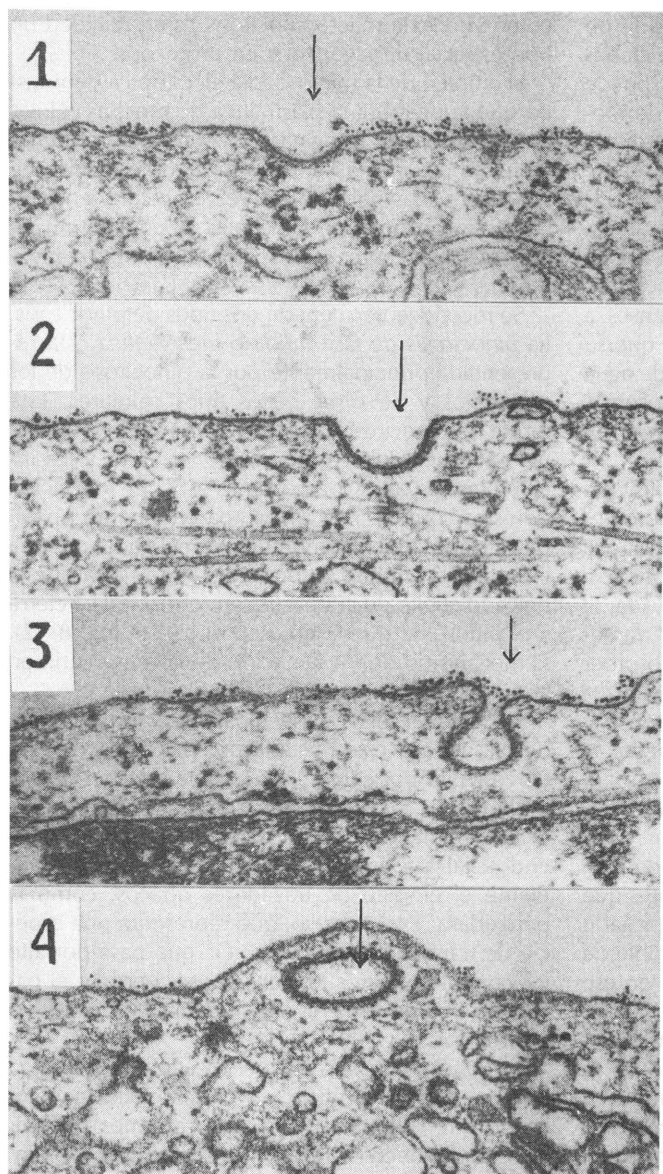


FIG. 8-32. Secuencia de acontecimientos en la formación de una vesícula con cubierta en la superficie de un fibroblasto de ratón. **1 y 2**, fositas con cubierta; **3**, fosita con cubierta en invaginación; **4**, una típica vesícula con cubierta (flechas). Se marcó la superficie celular con un conjugado de ferritina que se une a los sitios de un antígeno α . Obsérvese que las regiones de la superficie celular marcadas con ferritina quedan excluidas de las fositas y vesículas con cubierta. (Cortesía de M. S. Bretcher.)

de originar la fosita y por último la vesícula con cubierta. El cierre del cuello de las vesículas y la consiguiente separación de la membrana plasmática están mediados por una proteína conocida como *dinamina*, de la familia de las proteínas motoras microtubulares que analizamos en el capítulo 5-14.

Es posible aislar y purificar las vesículas con cubierta. Con coloración negativa muestran un enrejado de pentágonos y hexágonos que constituye la cubierta (fig. 8-33). La cesta de clatrina se arma y se desarma muy rápido, a medida que lo requiere el ciclo funcional de la vesícula (fig. 8-34).

Utilizando un método de criofractura que permite obtener una vista tridimensional, se ha observado que al comienzo de su formación la jaula de

clatrina de la fosita con cubierta está compuesta por hexágonos. Luego, cuando la fosita comienza a invaginarse, aparecen pentágonos en la cubierta. Esta transformación de hexágono a pentágono podría ser el mecanismo generador de fuerza para la formación de la vesícula con cubierta. Con el microscopio electrónico puede observarse *in vitro* el armado de la cubierta de clatrina. La unidad de armado es un trímero (denominado también trisquelión) que tiene tres prolongaciones de 44,5 nm dobladas en la misma dirección. En cada vértice del hexágono o pentágono de clatrina hay un trímero y las proyecciones se extienden siguiendo dos bordes (fig. 8-34). El extenso contacto fibroso de los trisqueliones confiere fuerza mecánica y flexibilidad a la cubierta de clatrina.

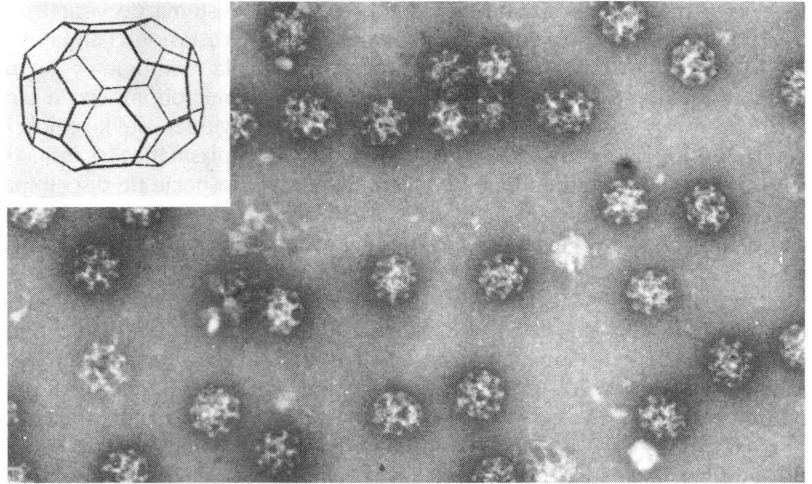


FIG. 8-33. Vesículas con cubierta aisladas y coloreadas negativamente. Se incluye un modelo que muestra un retículo de clatrina formado por hexágonos y pentágonos. 67.500 $\times$. (Cortesía de Barbara Pearse.)

Cabe señalar que la clatrina es una proteína multifuncional, capaz no sólo de un armado y desarmado rápidos, sino también de unirse a diferentes membranas celulares. Los trisqueliones son moléculas flexibles que pueden asociarse en forma de pentágonos o hexágonos y dar lugar a superficies de diversa curvatura para cubrir vesículas de diferente tamaño. La cesta de clatrina contiene también algunas proteínas menores y una de ellas (cadena liviana de la clatrina) sirve para unir los trisqueliones.

Asociada a las vesículas se identificó a una proteína, la dinamina, cuya función sería la de cerrar

el cuello de aquéllas, de modo de liberarlas de la membrana plasmática.

VESÍCULAS CON CUBIERTA. ENDOSOMAS

8-49. Funciones de las vesículas con cubierta. Endocitosis mediada por receptores

En una célula existen por lo menos diez tipos diferentes de membranas de composición lipídica y proteica característica. Si consideramos que las membranas son esencialmente fluidas y que existe un amplio transporte entre ellas, ¿cómo puede mantener la célula esta diversidad? Un modo de

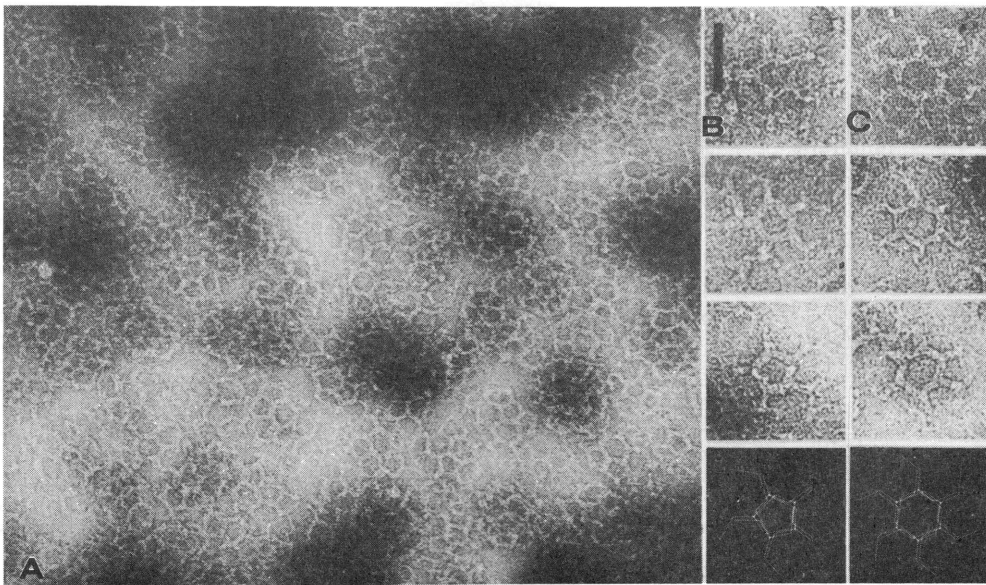


FIG. 8-34. Pequeños fragmentos aislados de las celdas de clatrina observadas con coloración negativa durante el proceso de montaje. Se observa un campo general que contiene pentágonos y hexágonos. 105.000 $\times$. También se muestran con mayor aumento algunos pentágonos y hexágonos seleccionados. 195.000 $\times$. Los esquemas muestran la disposición de los trímeros (o trisqueliones) individuales que forman los pentágonos y hexágonos. (Cortesía de R. A. Crowther y B. M. F. Pearse.)

resolver este problema es suponer la existencia de microdominios en los cuales está limitada, en cierta medida, la difusión lateral de los componentes de la membrana.

Se observan vesículas con cubierta en muchas células en las que se produce una endocitosis selectiva de trocitos de membrana y macromoléculas de la membranas plasmáticas (fig. 8-35). Este tránsito ocurre también en dirección opuesta —es decir, hacia la membrana— y asimismo entre diferentes compartimientos de la membrana intracelular (por ejemplo, RE y complejo de Golgi). La función de las vesículas con cubierta parece estar directamente relacionada con el tránsito intracelular de membranas.

Cabe destacar que no todo el tránsito intracelular de membranas mediado por vesículas recubiertas depende de vesículas con clatrina. Existe un *tránsito constitutivo* entre el RE y el Golgi, entre las cisternas de Golgi y entre el retículo trans-Golgi, mediado por *vesículas recubiertas por coatómeros*. Estas proteínas comprenden varias subunidades llamadas COPs, y para su ensamble y la formación de vesículas requieren, a diferencia de la clatrina, el uso de ATP.

Al contrario de la endocitosis inespecífica en la cual el transporte es más bien indiscriminado, el

sistema de vesículas con cubierta es selectivo. Las cestas de clatrina envuelven regiones especiales de la membrana y las mantienen como una unidad o microdominio en tanto son transferidas a otras regiones de la célula (fig. 8-35). En la membrana plasmática las fositas con cubierta actúan como una especie de discriminador molecular que selecciona algunas regiones de la membrana para ser endocitadas, pero excluye otras. Esto se ve en el experimento de la figura 8-32, en el cual se observa que las fositas de clatrina excluyen regiones de la membrana plasmática que fueron marcadas con ferritina para localizar un antígeno especial. Cabe señalar que, junto con la proteína, el componente lipídico de la membrana también es invaginado para formar la vesícula con cubierta.

En el momento actual se atribuyen a las vesículas con cubierta numerosas funciones particulares; todas ellas están referidas al tránsito de membranas y de materiales unidos a receptores especiales. He aquí algunos ejemplos:

1. *Incorporación de vitelo en el ovocito de gallina*. Es bien sabido que la vitelogenina, principal proteína del vitelo del huevo, es transportada desde el plasma sanguíneo al ovocito por medio de vesículas con cubierta. En un huevo de gallina se calcula que hay 10^{14} receptores que cubren gran

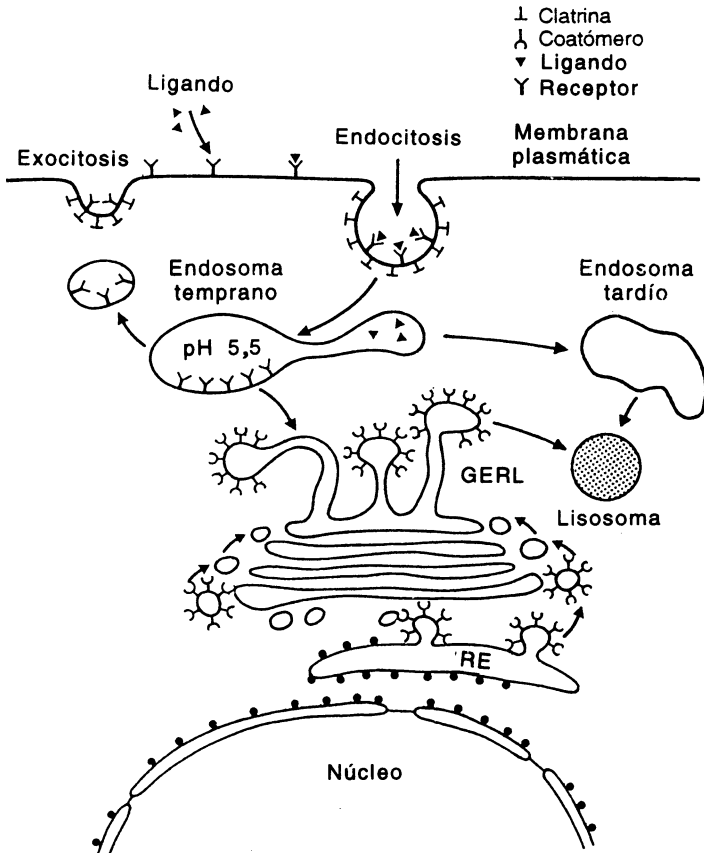


FIG. 8-35. Diagrama que ilustra la endocitosis dependiente de receptores y que involucra vesículas con cubierta y endosomas. El ligando interactúa con receptores de superficie y ambos son incorporados por vesículas provistas de una cubierta de clatrina. El pasaje de la vesícula al endosoma se caracteriza por un descenso del pH a 5,5 y la separación del receptor y el ligando. Mientras que el ligando es transferido al lisosoma, el receptor es reciclado de vuelta a la membrana plasmática por vesículas con clatrina y exocitosis. Las vesículas con clatrina también intervienen en la transferencia de material desde el retículo de trans-Golgi (GERL) a los endosomas y lisosomas. Se indican también las vesículas con revestimiento de coatómero (COPs) en el tránsito entre el RE y el Golgi.

FIG. 8-36. Fibroblasto coloreado con antisuero contra la clatrina mediante inmunofluorescencia indirecta. Nótese la presencia de un modelo punteado característico que se debe a la coloración de las fositas con cubierta que se encuentran en la superficie celular o de las vesículas con cubierta próximas. 2.000×. (Cortesía de E. M. Merisko, M. G. Farquhar y G. E. Palade.)



parte de la membrana y que por día se puede incorporar hasta un gramo de proteína. Las proteínas del vitelo se acumulan hasta que se produce el desarrollo embrionario, cuando son fagocitadas por el saco vitelino. En ese momento los productos catabólicos son utilizados por el embrión.

2. *Transferencia de inmunoglobulinas (IgG) maternas al feto.* En los animales superiores el transporte del IgG a través de la placenta provee al recién nacido de un conjunto de anticuerpos que le permiten protegerse en esa etapa temprana, cuando el sistema inmune no se ha desarrollado por completo. Esta protección se complementa con la endocitosis de anticuerpos de la leche materna en el intestino del niño. De allí la importancia de la alimentación con leche materna.

3. *Incorporación de macromoléculas y sustancias unidas a proteínas* (por ejemplo, colesterol, hierro y vitamina B₁₂). Esta función implica también la endocitosis mediada por receptores de hormonas proteicas y factores de crecimiento como insulina, gonadotrofinas, factor epidérmico, transferrina (proteína transportadora de hierro). El mismo mecanismo actúa también en la penetración de toxinas (como la toxina diftérica) y de algunos virus.

4. *Reciclado de membranas a partir de gránulos secretorios y vesículas sinápticas.* En todos estos ejemplos y en otros hay receptores especiales en las fositas con cubierta de la membrana. Estos receptores reconocen y fijan las moléculas que luego son incorporadas a vesículas con cubierta por este mecanismo endocítico (fig. 8-35).

Para considerar con más detalle la función de la vesícula con cubierta utilizaremos el caso de la incorporación de lipoproteínas de baja densidad

(LDL) transportadoras de colesterol en fibroblastos humanos. La LDL es una partícula grande que se origina en el hígado y circula en el plasma sanguíneo.

En un fibroblasto cultivado hay cerca de 10.000 receptores que se reconocen mediante el uso de LDL unida a ferritina. Si este complejo se agrega a 4°C, se produce la fijación al receptor pero no se inicia la endocitosis. Las partículas de LDL-ferritina ocupan el 2% de la superficie celular y se hallan en fositas con cubierta. Si luego se calienta la célula a 37°C, en pocos minutos el complejo desaparece de la superficie y se lo encuentra en vesículas con cubierta de clatrina y más tarde en endosomas (véase más adelante) y lisosomas. En los lisosomas las LDL se degradan y el colesterol queda libre para incorporarse a las membranas.

Cabe mencionar que el receptor de LDL ha sido purificado y secuenciado. El estudio de la síntesis de este receptor se facilitó por el hallazgo de defectos genéticos que causan la enfermedad llamada hipercolesterolemia familiar, en la cual se produce una aterosclerosis temprana. Estas mutaciones bloquean el movimiento de los receptores desde el RE al aparato de Golgi y desde la membrana plasmática a las vesículas con cubierta. Como resultado, no hay degradación de LDL en los lisosomas.

Otra manera de detectar las depresiones y vesículas con cubierta es mediante el uso de anticuerpos anticlatrina. En fibroblastos cultivados se observó que esta proteína está concentrada en la región perinuclear. Como se muestra en la figura 8-36, aparece también en forma de puntos sobre la superficie celular, en regiones que pueden ser iden-

gi hacia la membrana plasmática. Todos los pasos que comprende el transporte a cargo de las vesículas con cubierta dependen de energía y pueden ser detenidos por inhibidores de la respiración celular.

En relación con el tránsito intracelular, la célula polarizada epitelial plantea problemas especiales. En este caso las proteínas de membrana pueden segregarse e incorporarse tanto en la región luminal como en la basolateral de la superficie celular. Como se mencionó en el capítulo 5, en estas células hay uniones estrechas que son importantes para establecer diferencias regionales en las membranas. Estas diferencias han podido demostrarse mediante el uso de dos virus que brotan de la célula con polaridades diferentes. Por ejemplo, mientras el virus de la estomatitis vesicular y la glucoproteína G salen por la región basolateral, el virus de la gripe es transportado directamente a la superficie luminal. Estos resultados sugieren que las glucoproteínas pueden salir del complejo de Golgi y dirigirse por medio de vesículas transportadoras a regiones específicas de la membrana celular.

Como conclusión general podemos decir que mediante el uso de las vesículas con cubierta la célula resuelve el problema de la selección y el transporte de diferentes proteínas y lípidos. En consecuencia, es válido considerar que estas vesículas son los intermediarios claves en la mayor parte de las funciones de selección y transporte que se desarrollan dentro de las células eucarióticas.

8-51. *El endosoma y el tránsito de ligandos y receptores*

En los últimos años, numerosas evidencias apoyan la existencia de otro organoide, el *endosoma* o *reptosoma*, relacionado con el tránsito de ligandos y receptores. La endocitosis mediante vesículas cubiertas con clatrina es seguida por vesículas y túbulos de 200 a 400 nm que carecen de cubierta y se mueven en forma saltatoria. Estos endosomas llegan a la región del Golgi, donde se fusionan con elementos tubulares del retículo trans-Golgi (fig. 8-35).

Una característica importante del endosoma es que su interior se acidifica con rapidez a un pH entre 5 y 5,5. Por lo tanto, en una célula hay dos compartimientos de pH ácido: el endosoma y el lisosoma. Como en este último, la acidificación del endosoma se puede estudiar mediante la endocitosis de fluoresceína unida a dextrano. El pH endosómico puede determinarse por los cambios en el espectro de fluorescencia. Es posible demostrar que tan pronto como las vesículas con cubierta pierden la clatrina y se convierten en endosomas, se produce la acidificación, la cual depende de una bomba protonica alimentada por ATP.

En el caso antes mencionado de la endocitosis de LDL, se demostró que, mientras el ligando es transportado hasta el lisosoma, el receptor de LDL es reciclado hacia la membrana plasmática. En este mecanismo de salvamento del receptor el endosoma desempeña el papel principal. Se piensa que a causa de la acidificación se produce la separación de la LDL del receptor. Este último permanece en la membrana y puede ser transportado de vuelta a la membrana celular. En cambio, el contenido del endosoma con la LDL es transferido por fusión al lisosoma.

El papel principal del endosoma parece ser el de permitir la entrada del ligando a la célula evitando la inmediata fusión con los lisosomas. En cambio, el material que es endocitado por un mecanismo de fagocitosis llega rápidamente al compartimiento lisosómico.

Debe recordarse que los endosomas difieren de los lisosomas también en el hecho de que carecen de enzimas degradantes.

El estudio de la endocitosis de diversas macromoléculas ha revelado que el mecanismo de degradación puede diferir en cada caso. Por ejemplo, tanto el ligando como el receptor del factor de crecimiento epidérmico son degradados en los lisosomas. Por otra parte, la proteína transportadora del hierro, transferrina, no es degradada, lo mismo que su receptor. Sólo el hierro, separado de la transferrina, es incorporado a la célula. Uno de los mejores ejemplos de endocitosis mediada por receptor lo constituye la penetración de asialoglucoproteínas (ASGP) (proteínas sin ácido siálico) de la sangre a los hepatocitos. Se ha observado que mientras la degradación de ASGP es muy rápida (minutos), la vida media del receptor es de 40 horas o más. Esta discrepancia pudo explicarse mediante estudios de seguimiento del ligando y del receptor, marcados con diferentes marcadores inmunohistoquímicos, realizados con el microscopio electrónico. Se observó que la ASGP se une a las fositas con cubierta de clatrina que contiene el receptor. Luego es captada por endocitosis en las vesículas con cubierta; esto es seguido por estructuras tubulovesiculares que pierden la cubierta. A dichos organoideos se los denominó CURL —es decir, compartimiento para el desacoplamiento de receptores y ligandos—. En éstos, la parte vesicular contiene el ligando y se fusiona con lisosomas, en los cuales es degradada la ASGP. Las porciones tubulares que pueden corresponder a endosomas son ricas en receptores y probablemente actúen como intermediarios en el reciclaje del receptor hacia la superficie celular.

En conclusión, el endosoma representa un compartimiento especial intercalado en el tránsito intracelular que se caracteriza por la falta de clatrina y

de enzimas hidrolíticas y por ser de pH ácido. El endosoma se conecta con la región transreticular del complejo de Golgi e interviene en el reciclaje de ciertos receptores y ligandos.

BIBLIOGRAFIA

- Acharya U., Elkin K., Vance J. and Malhotra V. (1995) Keeping Golgi membranes intact in the pericentriolar region of mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* 23:538.
- Acharya U. et al. (1995) The formation of Golgi stacks from vesiculated Golgi membranes requires two distinct fusion events. *Cell* 82:895.
- Arfin S. M. and Bradshaw R. A. (1988) Cotranslational processing and protein turnover in eukariotic cells. *Biochemistry* 27:7980.
- Armstrong J. (1995) Membrane traffic: Is the Golgi complex? *Curr. Biol.* 5:980.
- Avery S. V., Lloyd D., Harwood J. L. (1995) Influence of plasma membrane fluidity on phagocytotic activity in *Acanthamoeba castellanii*. *Biochem. Soc. Trans.* 23:5409.
- Bainton D. (1981) The discovery of lysosomes. *J. Cell Biol.* 91:66.
- Bennet M. K. (1995) SNAREs and the specificity of transport vesicle targeting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:581.
- Bishop W. R. and Bell R. M. (1988) Assembly of phospholipids into cellular membranes: Biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:579.
- Bourdon M. A., Krusius T., Campbell S., Schwartz N. B. and Ruhoslati E. (1987) Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3194.
- Bretscher M. S. and Munro S. (1993) Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* 261:1280.
- Burgoyne R. D. and Morgan A. (1993) Regulated exocytosis. *Biochem. J.* 293:305.
- Calakos N., Bennet M. K., Peterson K. E. and Scheller R. H. (1994) Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking. *Science* 263:1146.
- Caro L. G. and Palade G. E. (1964) Protein synthesis, storage and discharge in the pancreatic exocrine cell. A radioautographic study. *J. Cell Biol.* 20:473.
- Carter L. L., Redelmeier T. E., Woollweber L. A. and Schmidt S. L. (1993) Multiple GTP-binding proteins participate in clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 120:37.
- Connolly T. and Gilmore R. (1989) The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell* 57:599.
- Corthesy-Theulaz I., Paulonin A. and Pfeiffer S. R. (1992) Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 118:1333.
- Craig E. A. (1993) Chaperones: Helpers along the pathways to protein folding. *Science* 260:1902.
- Crowley K. S., Reinhart G. D. and Johnson A. E. (1993) The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the RE membrane early in translocation. *Cell* 73:1101.
- Dannenberg A. J. (1995) Gender-related differences in the amount and functional state in the liver UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem. Pharmacol.* 50:509.
- Denison M. S. and Whitlock J. P. (1995) Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P-450 genes. *J. Biol. Chem.* 270:1817.
- Deshaies R. J., Koch B. D. and Schekman R. (1988) The role of stress proteins in membrane biogenesis. *TIBS* 13:384.
- Dunn K. W. and Maxfield F. R. (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J. Cell Biol.* 117:301.
- Dunn W. A. (1990) Studies on the mechanisms of autophagia: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110:1923.
- Dunphy W. G. and Rothman J. E. (1985) Compartmental organization of the Golgi stack. *Cell* 42:13.
- Edberg J. C., Lin C. T., Lau D., Unkeless J. C. and Kimberly R. P. (1995) The Ca^{2+} dependence of human Fc receptor-initiated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 270:22301.
- Edwardson J. M. and Marciniak S. J. (1995) Molecular mechanisms in exocytosis. *J. Membrane Biol.* 146:113.
- Farquhar M. and Palade G. (1981) The Golgi apparatus 1954-1981: From artifact to center stage. *J. Cell Biol.* 91:77.
- Fawcett D. W. (1982) *The Cell*, 2nd Ed. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Frank M. M. and Fries L. F. (1991) The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immun. Today* 12:322.
- Freedman R. B. (1989) Protein disulfide isomerase: Multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* 57:1069.
- Fuchs R., Male P. and Mellman I. (1989) Acidification and ion permeabilities of highly purified rat liver endosomes. *J. Biol. Chem.* 264:221.
- Gaut J. R. and Hendershot L. M. (1993) The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Biol.* 5:589.
- Gibbons D. F. and Wiggins D. (1995) The enzymology of hepatic VLD lipoprotein assembly. *Biochem. Soc. Trans.* 23:495.
- Gierasch L. M. (1989) Signal sequences. *Biochemistry* 28:923.
- Glew R. H. et al. (1985) Lysosomal storage diseases. *Lab. Invest.* 53:250.
- Griffiths G. and Simons K. (1986) The trans Golgi network: Sorting at the exit side of the Golgi complex. *Science* 234:438.
- Gruenberg J., Griffiths G. and Howell K. E. (1989) Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J. Cell Biol.* 108:1301.
- Guengerich F. P. (1989) Characterization of human microsomal cytochrome P-450 enzymes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29:241.
- Hansen K. T. and Stenfoft K. (1995) Characterization of benzazepine UDP-glucuronosyl-transferases in laboratory animals and man. *Xenobiotica* 25:611.
- Hashimoto S., Bruno B., Lew D. P., Pozzan T., Volpe P. and Meldolesi J. (1988) Immunocytochemistry of calciosomes in liver and pancreas. *J. Cell Biol.* 107:2523.
- Helenius A. et al. (1983) Endosomes. *Trends Biochem. Sci.* 8:245.
- Hewlett L. J., Prescott A. R. and Watts C. (1994) The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J. Cell Biol.* 124:689.
- Hille Rehfeld A. (1995) Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochem. Biophys. Acta* 1241:177.
- Hirschberg C. B. and Snider M. D. (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Ann. Rev. Biochem.* 56:63.
- Hoang Vu C. et al. (1995) Functional and morphological changes in the thyroid gland following 5 days of pulsatile TRH stimulation in male rats. *J. Endocrinol.* 146:339.
- Hong W. and Tang B. L. (1993) Protein trafficking along the exocytotic pathway. *Bioassays* 15:231.
- Ishihara N. et al. (1995) Malfolded cytochrome P-450 (M1) localized in unusual membrane structures in the endoplasmic reticulum in cultured animal cells. *J. Biochem.* 11:397.
- Jentoft N. (1990) Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem. Sci.* 15:291.
- Joiner K. A., Fuhrman S. A., Miettinen H. M., Kasper L. H. and Mellman I. (1990) *Toxoplasma gondii*: Fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249:641.
- Jones A. L. and Fawcett D. W. (1968) Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital. *J. Histochem. Cytochem.* 14:215.

- Kaether C. and Gerdes C. C. (1995) Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein. *FEBS Lett.* 369:267.
- Kalleher D. J., Kreibich G. and Gilmore R. (1992) Oligosacaryltransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorins I and II and a 48 kd protein. *Cell* 69:55.
- Koch G. L. E. (1990) The endoplasmic reticulum and calcium storage. *Bioassays* 12:527.
- Kornfeld S. (1987) Trafficking of lysosome enzymes. *FASEB J.* 1:462.
- Kornfeld R. and Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54:631.
- Kornfeld S. and Melman I. (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:483.
- Lee C. and Chen L. B. (1988) The dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell* 54:37.
- Lenarz W. J. (1987) Protein glycosylation in the endoplasmic reticulum: Current topological issues. *Biochemistry* 26:7206.
- Liu J. P. and Robinson P. J. (1995) Dynamin and endocytosis. *Endoc. Rev.* 16:590.
- Lodish H. F., Kong N., Hirani S. and Rasmussen J. (1987) A vesicular intermediate in the transport of hepatoma secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 104:221.
- McIlhinney R. A. J. (1990) The fats of life: The importance and function of protein acylation. *Trends Biochem.* 15:387.
- McMahon H. T., Missler M., Li C. and Sudhof T. C. (1995) Complexins: Cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell* 83:111.
- Mayor S., Presley J. F. and Maxfield F. R. (1993) Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J. Cell Biol.* 121:1257.
- Moore P. B. (1995) Ribosomes seen through a glass less darkly. *Structure* 3:851.
- Murphy J. E., Pleasure I. T., Puszkun S., Prasad K. and Keen J. H. (1991) Clathrin assembly protein AP-3. *J. Biol. Chem.* 266:4401.
- Neufeld E. F., Lim T. W. and Shapiro L. J. (1975) Inherited disorders of lysosomal metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 44:357.
- Nunnari J. and Walter P. (1992) Protein targeting to and translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:573.
- Olsen B. R. (1992) Collagen biosynthesis. In Hay E. D. (ed.) *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd Ed., pp. 177-220. Plenum Press, New York.
- Orci L. (1985) Direct identification of prohormone conversion site in insulin-secreting cells. *Cell* 42 (2):671.
- Orci L., Glick B. S. and Rothman J. E. (1986) A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: Its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell* 46 (2):171.
- Orci L. M., Vasalli J. and Perrelet A. (1988) The insulin factory. *Sci. Am.* 256:85.
- Orci L., Palmer D. J., Amherdt M. and Rothman J. E. (1993) Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatmer and ARF proteins from the cytosol. *Nature* 364:732.
- Orci L., Palmer D. J., Ravazzola M., Perrelet A. and Rothman J. E. (1993) Budding from Golgi membranes requires the coatmer complex of non-clathrin coat proteins. *Nature* 362:648.
- Pelham H. R. (1989) Heat shock and the sorting of luminal ER proteins. *EMBO J.* 8:3171.
- Pelham H. R. (1995) Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:530.
- Pelham H. R. and Munro S. (1993) Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *Cell* 75:603.
- Pesonen M., Ansorge W. and Simons K. (1984) Transcytosis of the G protein of vesicular stomatitis virus after implantation into the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. Involvement of endosomes and lysosomes. *J. Cell* 99:796.
- Pley U. and Parham P. (1993) Clathrin: Its roles in receptor-mediated vesicular transport and specialised functions in neurons. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28:431.
- Prooks P. and Ashcroft F. M. (1995) Effects of divalent cations on exocytosis and endocytosis from single mouse pancreatic β -cells. *J. Physiol.* 487:465.
- Prydz K., Hovland K. S. and Osen I. (1995) The role of microtubules in apical and basolateral endocytosis in epithelial MDCK cells. *Biochem. Soc. Trans.* 23:535.
- Rambour A. and Clermont Y. (1990) Three-dimensional electron microscopy: Structure of the Golgi apparatus. *Eur. J. Cell Biol.* 51:189.
- Rennie J. (1993) SNAPS and SNAREs: Protein hooks help vesicles grab cell membranes. *Sci. Am.* 268:11.
- Rothman J. E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372:55.
- Rubin D. R. and Finley D. (1995) The proteasome: A novel-degrading organelle? *Curr. Biol.* 22:854.
- Sangiaco M. et al. (1995) Oligomeric structure of caveolin: Implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9407.
- Schnitzer J. E. (1993) Update of the cellular and molecular basis of capillary permeability. *Trends Cardiovasc. Med.* 3:124.
- Siegel V. (1995) A second signal recognition event required for translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell* 82:167.
- Smith C. M. and Reynard A. M. (1992) *Textbook of Pharmacology*. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Smythe E. and Warren G. (1991) The mechanism of receptor-mediated endocytosis. *Eur. J. Biochem.* 202:689.
- Sprang S. R. et al. (1988) Structural changes in glycogen phosphorylase induced by phosphorylation. *Nature* 336:215.
- Stoorvogel W. (1993) Arguments in favour of endosome maturation. *Biochem. Soc. Trans.* 21:711.
- Sun B. X., Fukuhara M. and Takanaka A. (1995) Characterization of benzopyrene metabolism and related cytochrome P-450 isozymes in Syrian hamster livers. *J. Toxicol. Env. Health* 46:47.
- Tager J. M. (1987) Inborn errors of cellular organelles: An overview. *J. Inher. Metab. Dis.* 10 (Suppl.):3.
- Takizawa P. A. and Malhotra V. (1993) Coatmers and SNAREs in promoting membrane traffic. *Cell* 75:593.
- Tartakoff A. M. (1988) Simplifying the Golgi complex. *Trends Biol. Sci.* 7:174.
- Towler D. A., Gordon J. I., Adams S. P. and Glase L. (1988) The biology and enzymology of eukariotic protein acylation. *Annu. Rev. Biochem.* 57:69.
- van Weert A. W. M. et al. (1995) Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J. Cell Biol.* 130:821.
- Vertel B. M., Walters L. M. and Mills D. (1992) Subcompartments of the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Biol.* 3:325.
- Waddell I. D., Robertson K., Burchell A., Hume R. and Burchell B. (1995) Evidence for glucuronide sorting by human hepatic endoplasmic reticulum. *Mol. Membr. Biol.* 12:283.
- Watkins S. L., Scott H. M. and Burchell A. (1995) Glucosyl-6-phosphatase expression during rat development. *Biochem. Soc. Trans.* 23:436.
- Weidman P. J. (1995) Anterograde transport through the Golgi complex: Do Golgi tubules hold the key? *Trends Cell Biol.* 5:302.
- Wiedmann M., Kurzalia T. V., Hartmann E. and Rapoport T. A. (1987) A signal sequence receptor in the endoplasmic reticulum membrane. *Nature* 328:830.
- Wileman T., Harding C. and Stahl P. (1985) Receptor-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 232:1.
- Yamashina S. (1995) Dynamic structure and function of Golgi apparatus in the salivary acinar cell. *J. Elect. Micr.* 44:124.
- Zhang Z. Y. and Kaminsky L. S. (1995) Characterization of human cytochromes P-450 involved in theophylline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* 50:205.

9 / Mitocondrias. Peroxisomas

José Hib

MITOCONDRIAS

9-1. La mayor parte de la energía que usa la célula es provista por el ATP

Las células necesitan energía para realizar los siguientes trabajos (fig. 9-1):

1. Sintetizar y degradar moléculas.
2. Transportar solutos en contra de gradientes electroquímicos a través de sus membranas (transporte activo).
3. Incorporar macromoléculas y partículas desde el exterior (endocitosis).
4. Secretar macromoléculas al medio extracelular (exocitosis).
5. Trasladarse (migración celular) o contraerse (las células musculares).
6. Desplazar sus propios componentes (orgánoides, macromoléculas, etc.).
7. Multiplicarse (mitosis, meiosis).

8. Recibir señales del exterior y conducir las hasta los sitios celulares adecuados.

La energía suele ser tomada de las moléculas de *ATP*. Estas permiten tener a mano, en un espacio muy reducido, gran cantidad de energía, de modo que pueda ser utilizada donde y tan pronto se la necesite. La mayor parte de la energía se halla depositada en las uniones químicas entre los fosfatos del *ATP*, llamadas *uniones de alta energía*, aunque suele utilizarse solamente la ligada al fosfato terminal (figs. 2-3 y 9-2). Así, cuando el *ATP* se hidroliza, junto con la liberación de la energía se genera *ADP* y un fosfato (fig. 9-3). Como vemos, el *ADP* se comporta como una pequeña “batería descargada”, que al cargarse por la unión de un fosfato se convierte en *ATP*, la “batería cargada”.

Las usinas generadoras de moléculas de *ATP* son las mitocondrias, que toman la energía depositada en las uniones covalentes de las moléculas derivadas de los alimentos y la transfieren al *ADP*. El *ATP* así formado sale de la mitocondria y se difunde por toda la célula, de modo que su energía pueda ser usada para la realización de las distintas actividades celulares. Al removerse la energía del *ATP*, se reconstituye el *ADP*, que vuelve a ingresar en las mitocondrias para recibir una nueva “carga” de energía.

Veremos que las células poseen una enorme cantidad de pequeñas usinas —las mitocondrias— cuya energía es distribuida a través de innumerables moléculas de *ATP*. Estas, como las mitocondrias, se localizan cerca de los sitios de consumo. Tal organización es bastante distinta de la existente por ejemplo en una ciudad, cuyas viviendas consumen la energía generada por una o unas pocas usinas de gran tamaño, que al estar alejadas de los puntos de consumo requieren una extensa red de cables para su distribución.

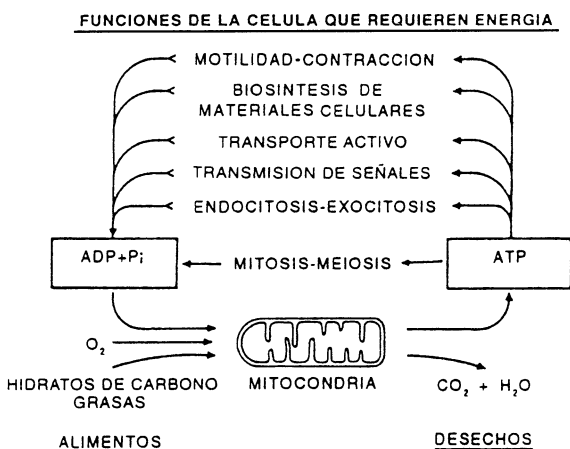


FIG. 9-1. Esquema que muestra a la mitocondria como la planta de producción energética de la célula. El *ATP* producido se emplea en las funciones indicadas.

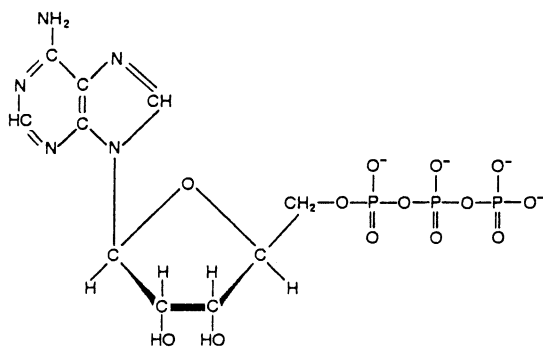


FIG. 9-2. Estructura química de la molécula de adenosina trifosfato (ATP).

9-2. La energía es tomada de los alimentos

Al provenir la energía de los alimentos, en última instancia proviene del sol. En efecto, en las plantas, partiendo de CO_2 y H_2O , la energía lumínica solar da lugar a una serie de reacciones que, además de generar O_2 , convierten la energía lumínica en energía química, que queda depositada en las uniones covalentes de las moléculas de los vegetales (cap. 19-16) (tabla 9-1). La energía de los alimentos vegetales es tomada por los animales herbívoros, que constituyen la fuente de energía de los animales carnívoros. El hombre, herbívoro y carnívoro a la vez, recurre a ambas clases de alimentos.

Las sustancias alimenticias se clasifican en hidratos de carbono, grasas, proteínas, minerales y H_2O , debiéndose incluir el O_2 . Los alimentos ingresan al organismo por el aparato digestivo, menos el O_2 , que lo hace por el aparato respiratorio. Una vez que la energía ha sido extraída de los alimentos, quedan como productos de desecho el CO_2 y el H_2O (tabla 9-1), a los que deben sumarse algunas sustancias nitrogenadas derivadas del catabolismo de las proteínas.

No toda la energía depositada en las uniones químicas de las moléculas alimenticias es transferida al ATP, ya que durante las sucesivas reacciones que conducen a su formación parte de esa energía se convierte en calor. Debe señalarse que en el escenario celular, desde el punto de vista termodinámico, el calor generado como consecuencia de las reacciones químicas es también un producto de

desecho. No obstante, en términos de aprovechamiento de energía para producir trabajo, las células pueden ser consideradas como máquinas sumamente eficientes, pues, comparadas con algunos motores, la relación consumo de combustible/ producción de trabajo da cifras mucho más favorables para las células. Así, en las células el 40% de la energía liberada sirve para actividades provechosas y el 60% se disipa como calor, mientras que en los motores tales cifras suelen ser del orden del 20% y el 80%, respectivamente.

La mejor performance lograda por las células se debe a que degradan los alimentos *en forma gradual*, por medio de enzimas que ellas mismas sintetizan. De este modo, la energía progresivamente liberada por las enzimas es transferida al ADP, también en forma gradual, lo que hace que el ATP se forme con mínima generación de calor. En cambio, en los motores mencionados el combustible es degradado en forma abrupta mediante detonaciones, durante las cuales una proporción considerable de energía se pierde como calor.

9-3. La energía de las moléculas alimenticias es extraída mediante oxidaciones

La mayor parte de la energía contenida en las moléculas de los alimentos es extraída mediante una sucesión de numerosísimas *oxidaciones*, al cabo de las cuales el oxígeno atmosférico se une a los átomos de hidrógeno de las citadas moléculas para formar H_2O . Vinculando esto último con lo

TABLA 9-1. Diferencias entre los procesos energéticos de las plantas (fotosíntesis) y de los animales (fosforilación oxidativa)

Fotosíntesis	Fosforilación oxidativa
En cloroplastos	En mitocondrias
Reacción endergónica:	Reacción exergónica:
Energía + CO_2 + H_2O → Alimentos + H_2O	Alimentos + O_2 → Energía + CO_2 + H_2O
Hidroliza el agua	Forma agua
Libera O_2	Libera CO_2
Solo en presencia de luz	Independiente de la luz
Periódica	Continua

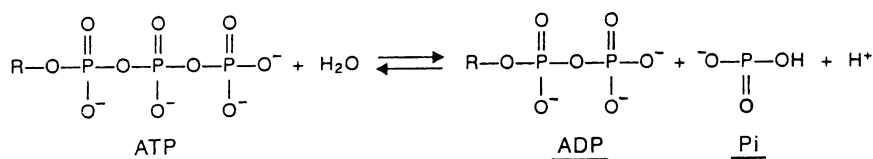


FIG. 9-3. Hidrólisis y síntesis del ATP.

Para asegurarse un abastecimiento continuo de energía, las células guardan en el citosol parte de la glucosa y de los ácidos grasos bajo la forma de *glucógeno* y de *triglicéridos*, respectivamente. Más aún, existen células especializadas en las que se depositan grandes reservas de estas moléculas —por ejemplo, glucógeno en los hepatocitos y triglicéridos en las células adiposas—, desde las cuales se movilizan cuando es necesario.

9-6. La glucólisis tiene lugar en el citosol

Mediante una serie de reacciones químicas agrupadas bajo el nombre de *glucólisis* —en las que intervienen 10 enzimas localizadas en el *citosol*—, cada molécula de glucosa, que posee 6 átomos de carbono, da lugar a dos moléculas de *piruvato*, cada una compuesta por 3 carbonos (fig. 9-6). Durante este proceso —que constituye la segunda etapa de la degradación de los glúcidos— se invierte la energía de dos ATP, pero se generan otros cuatro, de modo que se produce una ganancia de dos ATP, uno por cada piruvato.

Más aún, una parte de la energía liberada durante la glucólisis no es transferida al ATP directamente sino que promueve la reducción de dos NAD^+ , uno por cada piruvato. Más adelante veremos cómo, en las mitocondrias, la energía contenida en los dos NADH surgidos de la glucólisis es transferida al ATP (sección 9-18).

Volviendo a los piruvatos, digamos que dejan el citosol e ingresan en las mitocondrias.

9-7. En las mitocondrias se producen la descarboxilación oxidativa, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa

Por acción de un complejo multienzimático llamado *piruvato deshidrogenasa*, presente en las *mitocondrias*, cada piruvato (3 C) se convierte en una molécula de 2 carbonos. Esta molécula es un *grupo acetilo* que se liga a una coenzima —la *coenzima A* (CoA)—, con la que compone la acetilcoenzima A (*acetil CoA*) (figs. 9-7 y 9-12). El carbono es removido del piruvato junto a dos oxígenos, lo que produce un CO_2 . El piruvato cede también un ion hidruro o H^- (un H^+ y dos e^-). Estas reacciones reciben el nombre de *descarboxilación oxidativa*, la tercera etapa en la degradación de los glúcidos.

Durante la descarboxilación oxidativa se genera energía suficiente para reducir un NAD^+ , lo cual se traduce en la formación de una molécula de NADH por cada grupo acetilo producido (fig. 9-12). Oportunamente veremos cómo la energía depositada en este NADH es transferida al ATP.

A continuación —siempre en las mitocondrias— los átomos de C e H del grupo acetilo (recordemos

que se halla unido a la CoA) son oxidados, de modo que se generan CO_2 y H_2O . Las oxidaciones son graduales, y en su transcurso se libera la energía depositada en las uniones covalentes entre esos

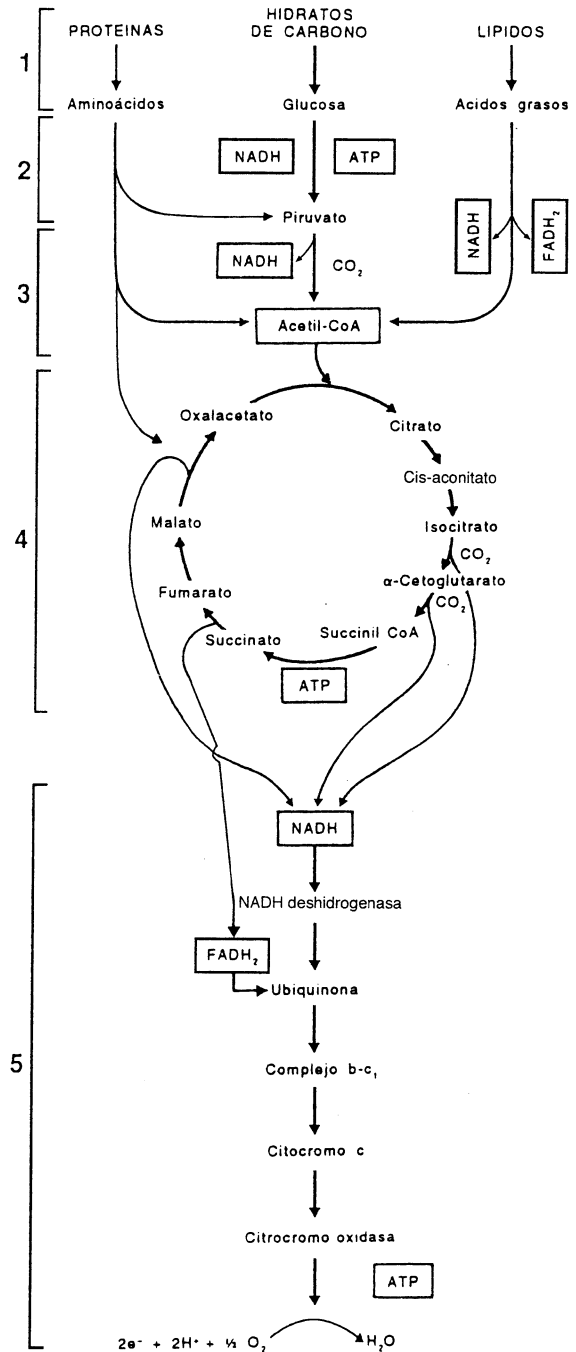


FIG. 9-5. Esquema general de la degradación de los alimentos una vez incorporados al organismo; 1) degradación enzimática en el tubo digestivo; 2) glucólisis; 3) descarboxilación oxidativa; 4) ciclo de Krebs; 5) fosforilación oxidativa.

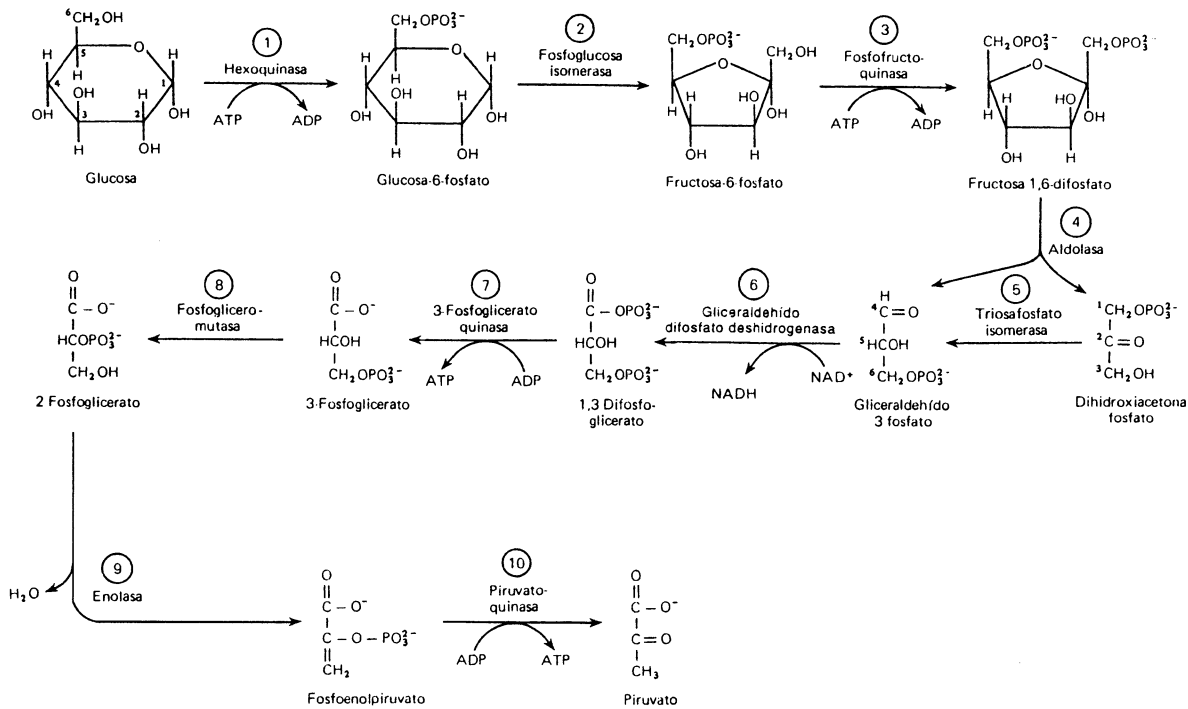


FIG. 9-6. Etapas de la glucólisis y enzimas intervinientes.

átomos, que pasa al ATP. Ambos procesos —las oxidaciones y la formación de ATP— ocurren en dos tiempos; el CO₂ se genera en el primero y el H₂O en el segundo.

El primero de esos tiempos —que representa la cuarta etapa de la degradación de los glúcidos— abarca una sucesión de oxidaciones en el llamado *ciclo de Krebs* (o ciclo del ácido cítrico) (fig. 9-5). De la energía liberada en esta etapa, una pequeña fracción se utiliza para generar un ATP en forma directa (aunque por vía del GTP), pero la mayor parte es aprovechada para reducir tres NAD⁺ —que entonces se convierten en otros tantos NADH— y un FAD, que de estar oxidado pasa a su estado reducido o FADH₂.

En el segundo tiempo, contemporáneo al del ciclo de Krebs, los NADH y los FADH₂ son oxidados de manera gradual por una serie de moléculas que se agrupan bajo el nombre de *cadena transportadora de electrones* —o cadena respiratoria—, de modo que vuelven a convertirse en NAD⁺ y FAD, respectivamente. Cuando ambos dinucleótidos son oxidados se libera la energía depositada en sus moléculas y ésta es transferida al ADP presente en las mitocondrias, el cual, al fosforilarse, se convierte en ATP. Esta etapa —que es la quinta y última de la degradación de los glúcidos—, a causa de que da lugar a oxidaciones acopladas a fosforilaciones, recibe el nombre de *fosforilación oxidativa* (fig. 9-5).

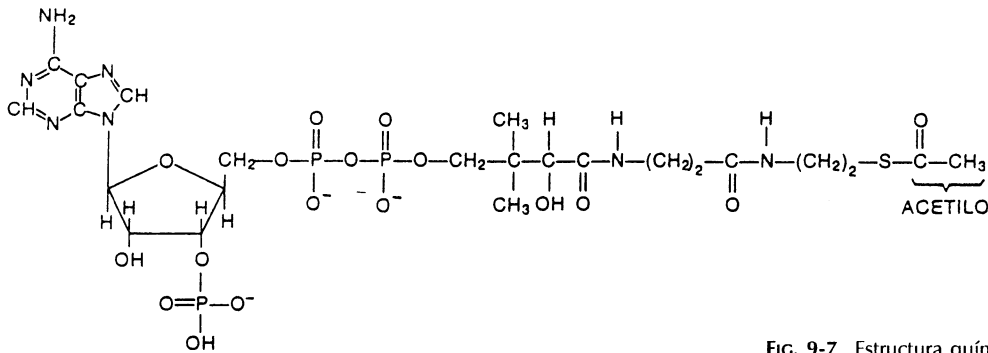


FIG. 9-7. Estructura química de la acetilcoenzima A (acetil CoA).

9-8. La mayor parte de los ácidos grasos son degradados en las mitocondrias

A diferencia de la glucosa, los ácidos grasos —provenientes de los alimentos o de la movilización de las reservas de grasa en las células adiposas— no se escinden en el citosol. Pasan directamente a las mitocondrias, donde una serie de enzimas específicas los degradan, para generar cada uno entre ocho y nueve *grupos acetilo*. Por cada grupo acetilo escindido se genera energía suficiente para producir un NADH y un FADH₂ (fig. 9-11). Seguidamente, previa asociación con sus correspondientes CoA, los grupos acetilo ingresan al ciclo de Krebs y cada uno genera un ATP, tres NADH y un FADH₂. La energía contenida en estos dinucleótidos y en los derivados de la escisión de los ácidos grasos es finalmente transferida al ATP por fosforilación oxidativa.

9-9. Los productos iniciales de la degradación de los aminoácidos son muy variados

En lo que atañe a los *aminoácidos*, cuando no se utilizan para sintetizar proteínas u otras moléculas y son requeridos para generar energía, se convierten —mediante distintas enzimas específicas— algunos en piruvato, otros en el grupo acetilo de la acetil CoA y otros en algunas de las moléculas intermediarias del ciclo de Krebs.

DESCRIPCION GENERAL Y ESTRUCTURA DE LAS MITOCONDRIAS

9-10. Las mitocondrias se encuentran en todos los tipos celulares

Las mitocondrias se encuentran en todos los tipos celulares. Constituyen uno de los ejemplos de integración morfofuncional más admirables, ya que proveen el andamiaje sobre el que asientan las innumerables moléculas que participan en las reacciones que transfieren la energía depositada en los alimentos a una molécula extraordinariamente versátil como es el ATP.

Las mitocondrias son cilíndricas, aunque experimentan cambios de forma sutiles, derivados de su actividad. En promedio miden 3 µm de largo y su diámetro es de 0,5 µm. Su número varía según el tipo celular. En los hepatocitos, por ejemplo, suelen hallarse entre 1.000 y 2.000 mitocondrias (fig. 9-8). Se encuentran ubicadas en las regiones de las células donde la demanda de energía es mayor, por lo que se desplazan de un lado a otro del citoplasma hacia las zonas necesitadas de energía. Los microtúbulos y sus proteínas asociadas intervienen en tales desplazamientos (cap. 5-15). No obstante, en algunos tipos celulares, como los espermatozoides, las células musculares y las células grasas, las mitocondrias permanecen en lugares fijos.

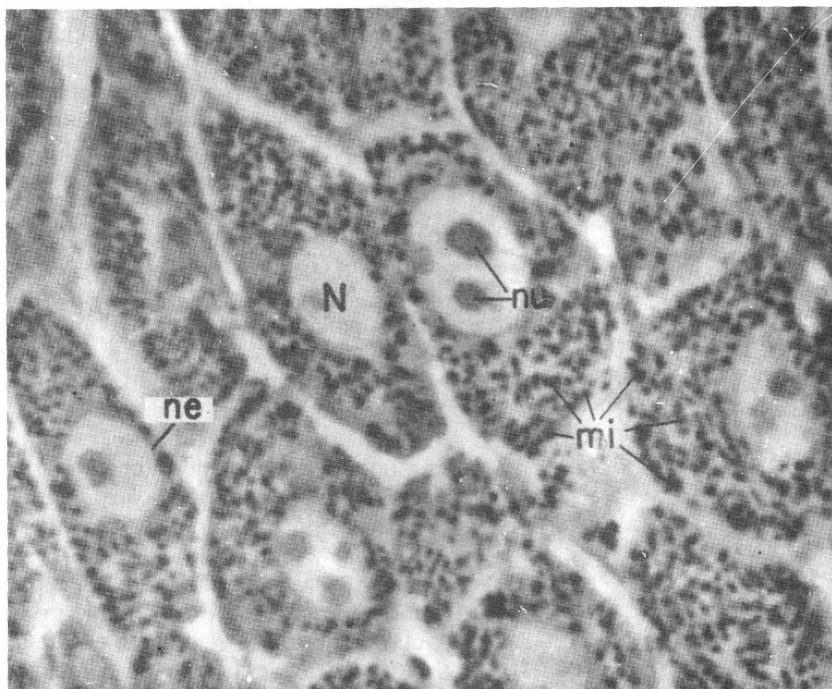


FIG. 9-8. Células hepáticas de la rata. N, núcleo; nu, nucléolo; ne, envoltura nuclear; mi, mitocondrias.

9-11. Las mitocondrias poseen dos membranas y dos compartimientos

Las mitocondrias poseen *dos membranas* —una externa y otra interior— que dan lugar a *dos compartimientos*, el espacio intermembranoso y la matriz mitocondrial (fig. 9-9).

Membrana externa. La membrana externa es permeable a los solutos presentes en el citosol, pero no a las macromoléculas. Esto se debe a que su bicapa lipídica presenta, entre otros componentes, unas proteínas transmembranosas llamadas *porinas*, las cuales forman canales acuosos de regular tamaño por los que pasan libremente iones y moléculas de hasta 5 kDa. Además posee *enzimas* capaces de modificar a los ácidos grasos para que éstos puedan atravesar la membrana interna e ingresar en la matriz mitocondrial, donde son degradados a grupos acetilo.

Espacio intermembranoso. Dada la presencia de las porinas en la membrana externa, su contenido de solutos es similar al del citosol.

Membrana interna. La membrana interna desarrolla plegamientos hacia la matriz que dan lugar a las llamadas *crestas mitocondriales*, formadas con el objeto de aumentar la superficie membranosa. La forma y el número de las crestas varían en los distintos tipos celulares.

La membrana interna de las mitocondrias presenta un alto grado de especialización, y ambas caras de su bicapa lipídica exhiben una marcada asimetría. En ella se localizan, entre otras, las siguientes moléculas:

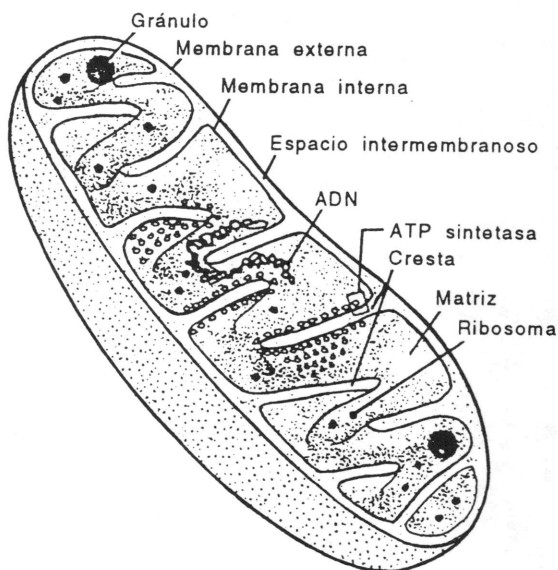


FIG. 9-9. Esquema tridimensional de una mitocondria cortada longitudinalmente. Las crestas aparecen tapizadas con moléculas de ATP sintetasa.

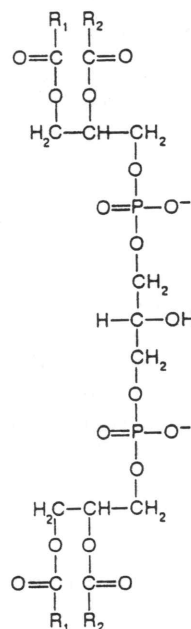


FIG. 9-10. Estructura química del difosfatidilglicerol o cardiolipina.

1. Un fosfolípido doble —el *difosfatidilglicerol* o *cardiolipina*— que impide el pasaje de la mayoría de los solutos en cualquier dirección (fig. 9-10).

2. Diversas *proteínas transportadoras* que permiten el pasaje selectivo de iones y moléculas, algunas desde el espacio intermembranoso a la matriz mitocondrial y otras desde la matriz al espacio intermembranoso (fig. 9-11).

3. Las moléculas involucradas en las oxidaciones de la fosforilación oxidativa, que en conjunto componen la cadena transportadora de electrones (o cadena respiratoria) (fig. 9-11). Existen innumerables copias de estos conjuntos en el plano de la bicapa lipídica, cada uno integrado por tres grandes complejos enzimáticos —llamados *NADH deshidrogenasa*, *b-c₁* y *citocromo oxidasa*— entre los cuales se encuentran dos transportadores de electrones más pequeños, la *ubiquinona* y el *citocromo c*.

4. La *ATP sintetasa*, que es un complejo proteico ubicado en las inmediaciones de la cadena transportadora de electrones. Presenta dos sectores, uno transmembranoso (porción F_0), por el que regresan los H^+ desde el espacio intermembranoso a la matriz mitocondrial, y otro orientado hacia dicha matriz (porción F_1) (fig. 9-15). Este último es el que cataliza la formación de ATP a partir de ADP y fosfato, o sea, es el responsable de las fosforilaciones a que hace referencia el término “fosforilación oxidativa”. El origen de la energía que utiliza la ATP sintetasa para concretar tales fosforilaciones se describirá más adelante.

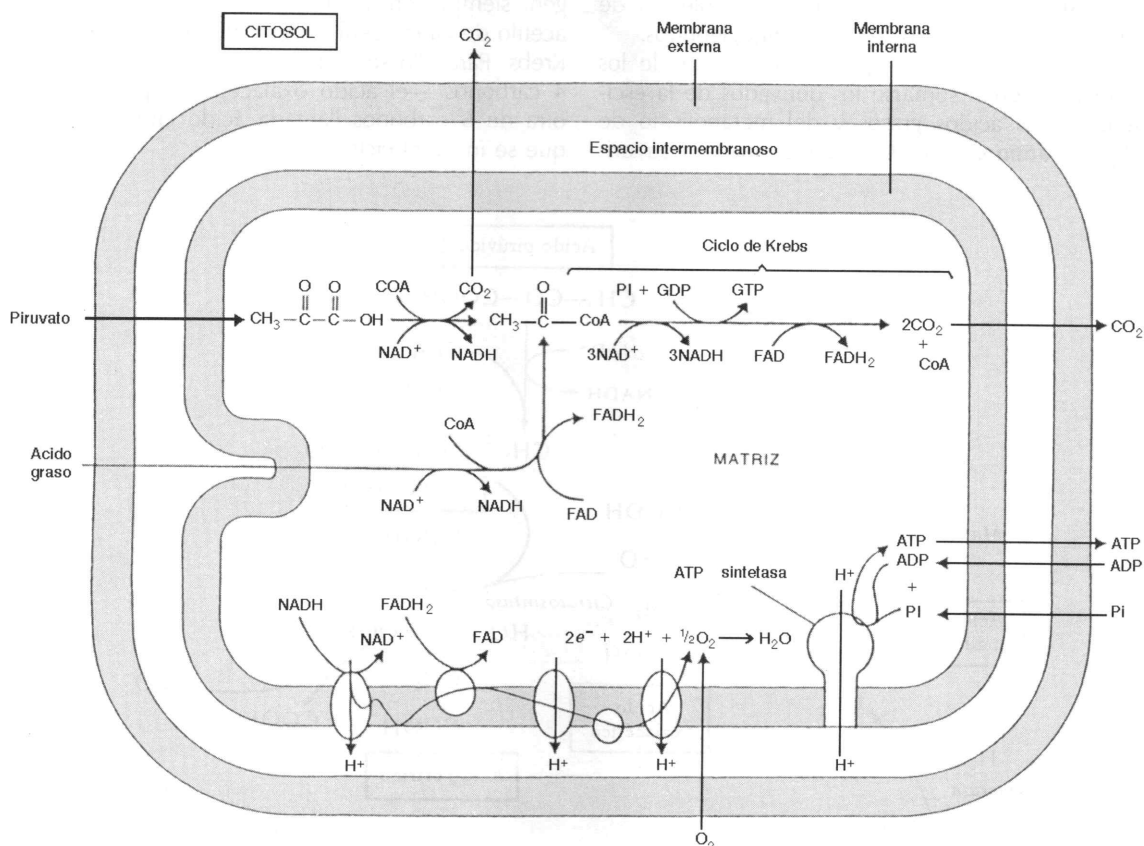


FIG. 9-11. Representación gráfica de la mitocondria, en la que se muestran las reacciones correspondientes a la descarboxilación oxidativa, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Puede también observarse la degradación de los ácidos grasos.

Matriz mitocondrial. La matriz mitocondrial contiene diversas moléculas, entre ellas:

1. El complejo enzimático piruvato deshidrogenasa, involucrado en la descarboxilación oxidativa que convierte al piruvato en acetil CoA (fig. 9-11).
2. Las enzimas del ciclo de Krebs, excepto la succinato deshidrogenasa (fig. 9-11).
3. O_2 , ADP, fosfato.
4. Las coenzimas A (CoA) y NAD^+ .
5. Las enzimas que escinden a los ácidos grasos.
6. Gránulos de distinto tamaño, compuestos probablemente por calcio (fig. 9-9).
7. Varias copias de una molécula de ADN circular (figs. 9-9, 9-17 y 9-18).
8. Trece tipos de ARNm, codificados por otros tantos genes del ADN mitocondrial.
9. Dos tipos de ARNr, los cuales, asociados a proteínas, forman auténticos ribosomas, parecidos a los citosólicos (fig. 9-9).
10. Veintidós tipos de ARNt para los distintos aminoácidos, a partir de los cuales se construyen, dentro de la misma mitocondria, trece de sus proteínas.

FUNCIONES DE LAS MITOCONDRIAS

9-12. La función principal de las mitocondrias es generar ATP

Como se mencionó antes, en presencia de O_2 , mediante la descarboxilación oxidativa, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, la mitocondria traslada al ADP —para formar ATP— la energía depositada en las uniones químicas de las moléculas de los alimentos. Analizaremos estos procesos en el escenario biológico en que tienen lugar, es decir, cada uno en su respectivo sector dentro del andamiaje estructural de la mitocondria.

9-13. La descarboxilación oxidativa se produce en la matriz mitocondrial

Proveniente del citosol, el piruvato ingresa en la matriz mitocondrial, donde por acción de la piruvato deshidrogenasa pierde un C y se convierte en el grupo acetilo de la acetil CoA (figs. 9-5, 9-7 y 9-11). Recordemos que en esa conversión, además de CO_2 , se genera energía suficiente para formar

un NADH, de modo que por cada molécula de glucosa se originan dos de estos dinucleótidos.

A los grupos acetilo generados a partir de los piruvatos deben sumarse los derivados de la escisión de los ácidos grasos y del metabolismo de algunos aminoácidos. Cualquiera que sea su ori-

gen, siempre en la matriz mitocondrial, el grupo acetilo de cada acetil CoA se incorpora al ciclo de Krebs. Para ello se combina con una molécula de 4 carbonos —el ácido oxalacético— para formar otra de 6 carbonos llamada ácido cítrico, con la que se inicia el ciclo.

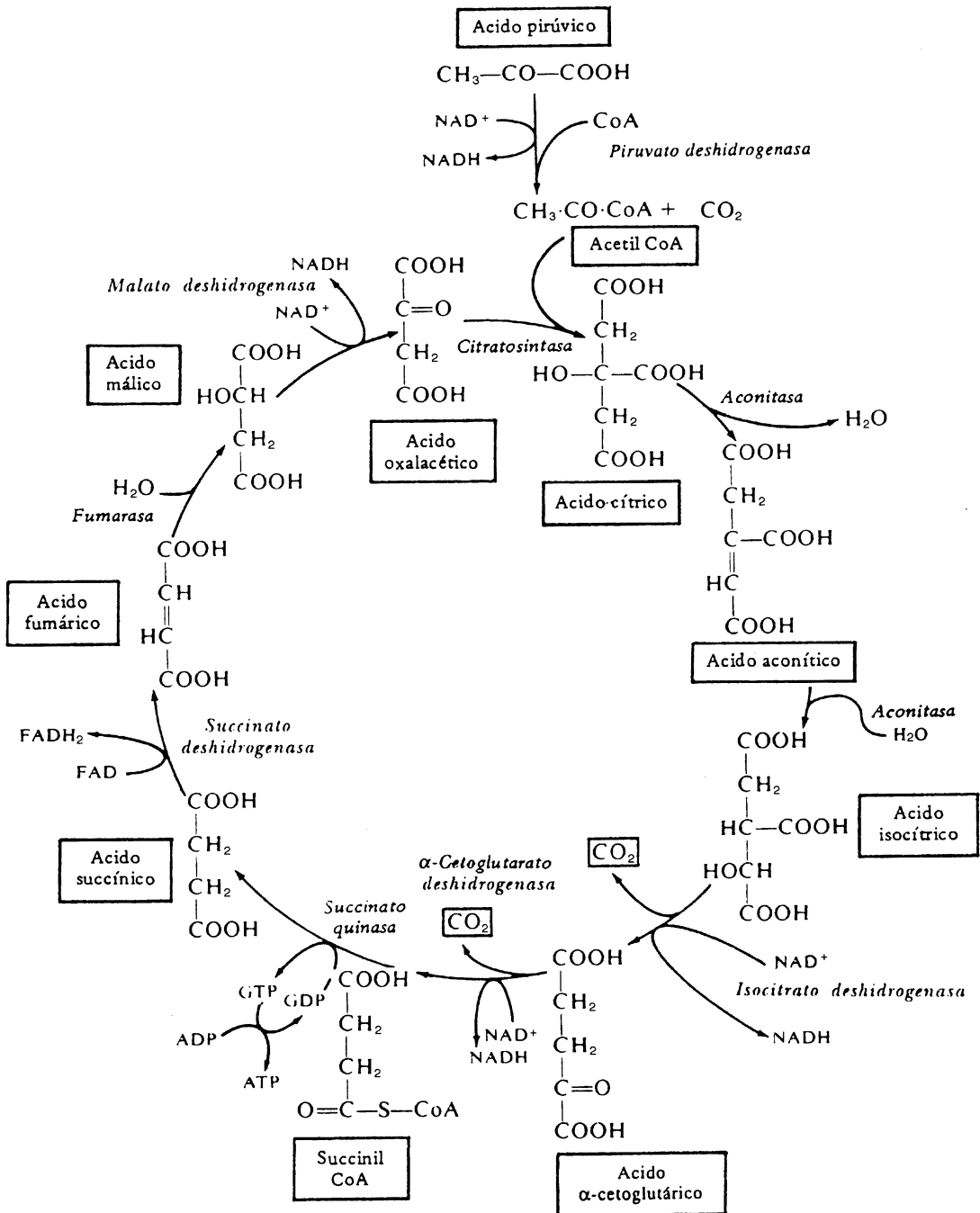


FIG. 9-12. El ciclo de Krebs (o ciclo del ácido cítrico) en las mitocondrias. Están representadas las sucesivas reacciones, las enzimas intervinientes y los productos del ciclo.

9-14. También las reacciones del ciclo de Krebs se producen en la matriz mitocondrial

Como puede apreciarse en la figura 9-12, el ciclo de Krebs (o ciclo del ácido cítrico) consiste en una serie de nueve reacciones químicas mediadas por otras tantas enzimas específicas. Estas actúan secuencialmente, y lo hacen de modo tal que el último de sus productos vuelve a ser un ácido oxalacético, el cual, al combinarse con el grupo acetilo de otra acetil CoA, genera otro ácido cítrico, lo que inicia un nuevo ciclo, y así sucesivamente mientras haya O_2 y grupos acetilo disponibles.

Al cumplirse cada vuelta del ciclo de Krebs, dos de los seis carbonos del ácido cítrico se oxidan a CO_2 . Ello genera energía suficiente para formar un ATP, tres NADH y un $FADH_2$. Puesto que son necesarias dos vueltas del ciclo para metabolizar las dos acetil CoA derivadas de la glucólisis de una molécula de glucosa, cada uno de estos monosacáridos da lugar a dos ATP, seis NADH y dos $FADH_2$. Debe advertirse que el ATP se genera a partir de GTP, que es el trifosfato surgido del ciclo.

Las moléculas de CO_2 , tanto las formadas en la descarboxilación oxidativa como en el ciclo de Krebs, pasan al citosol, de éste al espacio extracelular y finalmente a los eritrocitos, que las transportan hacia los pulmones para su eliminación.

9-15. Las oxidaciones de la fosforilación oxidativa tienen lugar en la membrana interna de la mitocondria

La energía contenida en los NADH y $FADH_2$ —provenientes de la descarboxilación oxidativa y del ciclo de Krebs— se transfiere al ATP luego de

una serie de reacciones químicas que comienzan con la ionización de ambos dinucleótidos. Luego los átomos de H liberados como consecuencia de las ionizaciones se disocian en H^+ y e^- . Ambas reacciones pueden expresarse mediante las siguientes ecuaciones:



Es importante señalar que los e^- surgidos de estos procesos poseen un elevado *potencial de transferencia*, es decir, una elevada carga de energía. En esas condiciones ingresan en la cadena transportadora de electrones, cuyos componentes fueron enumerados cuando se describió la membrana interna de la mitocondria (fig. 9-11).

Dado que cada componente de la cadena posee por los e^- una afinidad mayor que su predecesor, los e^- —ricos en energía al ingresar en la cadena— fluyen por ella en el siguiente orden:

Para los e^- cedidos por los átomos de H del NADH, el punto de entrada es la NADH deshidrogenasa. Desde ésta pasan a la ubiquinona, que los transfiere al complejo b-c₁. Los e^- dejan este complejo e ingresan al citocromo c, desde el cual pasan al quinto y último eslabón de la cadena, la citocromo oxidasa. Finalmente, luego de haber gastado la mayor parte de su energía, los e^- pasan a la matriz mitocondrial (fig. 9-13).

Por su lado, los e^- cedidos por los H del $FADH_2$ tienen como punto de entrada la ubiquinona, a partir de la cual fluyen por los restantes eslabones de la cadena en el mismo orden en que lo hacen los e^- cedidos por los H del NADH.

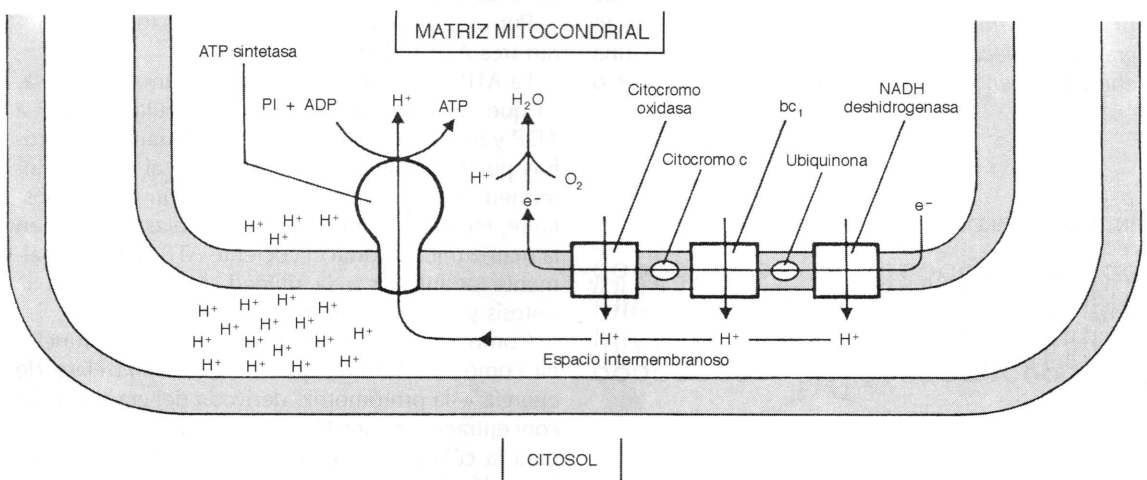


FIG. 9-13. Un sector de la mitocondria que muestra los complejos moleculares integrantes de la cadena transportadora de electrones (o cadena respiratoria) y la ATP sintetasa.

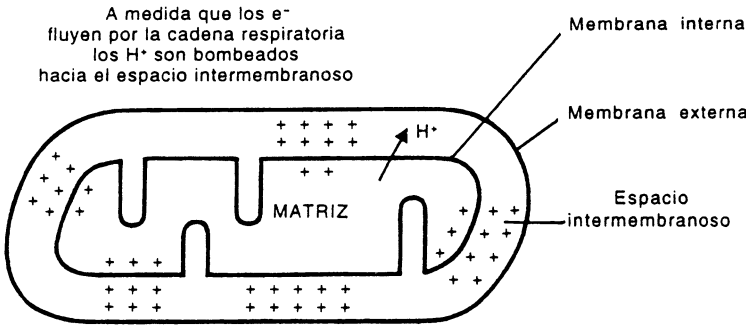


FIG. 9-14. Transferencia de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranoso.

Como vemos, en el curso de las reacciones de oxidorreducción que tienen lugar a lo largo de la cadena respiratoria, el potencial de transferencia de los electrones va disminuyendo, de modo que en cada etapa pasan a un estado de menor energía, que termina considerablemente reducida cuando abandonan el último eslabón de la cadena. A continuación analizaremos en qué se gasta esa energía.

Es utilizada para transferir los H^+ disueltos en la matriz mitocondrial al espacio intermembranoso (fig. 9-14). Ello requiere energía, ya que los H^+ deben ser transportados desde un medio en el que se hallan menos concentrados a otro en el que su concentración es mayor (transporte activo). El mecanismo que hace posible el bombeo de los H^+ no ha podido ser determinado. No obstante, se sabe que los H^+ salen al espacio intermembranoso a través de algunas proteínas de los complejos enzimáticos que integran la cadena respiratoria, las cuales actuarían como verdaderas bombas de H^+ .

Al existir un *gradiente de concentración* de H^+ entre ambos lados de la membrana mitocondrial interna, se establece un *gradiente de pH* (más alto en la matriz mitocondrial) y se afirma el potencial de membrana, que se hace más positivo en el espacio intermembranoso. Ambos —el gradiente de pH y el potencial de membrana— componen un *gradiente electroquímico* que se traduce en una *energía potencial singular*, llamada *protomotriz* o

protón motora, que impulsa a los H^+ a regresar a la matriz mitocondrial, ahora por transporte pasivo. En síntesis, conforme la energía suministrada por los e^- transfiere los H^+ al espacio intermembranoso, es absorbida por los propios H^+ , que la retienen, como acabamos de señalar, como energía protomotriz.

9-16. La fosforilación del ADP es mediada por la ATP sintetasa

En la sección 9-11 vimos que la *ATP sintetasa* está integrada por dos unidades que poseen localizaciones y funciones diferentes. Una atraviesa la bicapa lipídica (porción transmembranosa o F_0) y la otra da hacia la matriz mitocondrial (porción F_1) (fig. 9-15). La porción transmembranosa es la que permite el regreso de los H^+ a la matriz mitocondrial, mientras que la porción F_1 tiene por función catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y P (fosforilación); así, el regreso de los H^+ y la síntesis de ATP, si bien son procesos acoplados, se cumplen en lugares diferentes de la ATP sintetasa. La energía necesaria para esta síntesis es tomada de la energía protomotriz de los H^+ , que la van perdiendo durante su regreso a la matriz mitocondrial.

Por cada uno de los NADH procesados se generan tres ATP, y dos por cada $FADH_2$.

La ATP sintetasa puede también llamarse *ATPasa*, ya que es capaz de hidrolizar moléculas de ATP a ADP y fosfato. La energía liberada durante la hidrólisis puede servir para bombear H^+ al espacio intermembranoso a través de la porción F_0 . No obstante, recibe el nombre de ATP sintetasa porque en la matriz mitocondrial el cociente ATP/ADP normalmente es inferior a la unidad, lo cual lleva a la síntesis y no a la hidrólisis de ATP.

Como puede apreciarse, la ATP sintetasa funciona como una turbina que convierte una clase de energía —la protomotriz, derivada del gradiente de concentración de los H^+ — en otra más provechosa para la célula —la energía química depositada en las moléculas de ATP—.

El ATP sale al citosol a través de una proteína transmembranosa localizada en la membrana mito-

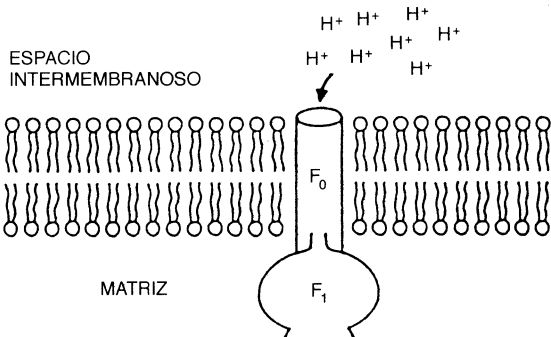


FIG. 9-15. Representación gráfica de la ATP sintetasa en la membrana mitocondrial interna.

condrial interna, la *ATP-ADP translocasa* (fig. 9-11). Como su nombre lo sugiere, por cada ATP que la atraviesa debe pasar un ADP en dirección contraria, es decir, desde el citosol a la matriz mitocondrial.

9-17. Los H^+ y los e^- se combinan con el oxígeno atmosférico para formar agua

Cabe ahora indagar sobre el destino de los e^- , los cuales, luego de perder una parte sustancial de su energía, han abandonado la cadena respiratoria y regresado a la matriz mitocondrial. Se combinan tanto con el O_2 que procede de la atmósfera como con los H^+ provenientes del espacio intermembranoso, lo que da lugar a la formación de H_2O (fig. 9-11). La atracción de los e^- por el O_2 se debe a que poseen una gran afinidad por éste, mayor de la que tienen por la citocromo oxidasa, lugar por donde salen de la cadena transportadora.

Con la formación del H_2O culmina la fosforilación oxidativa; se necesitan 4 e^- y 4 H^+ por O_2 para que se produzcan 2 moléculas acuosas. El H_2O es uno de los productos finales del metabolismo (el otro es el CO_2); pasa al citosol, desde donde sale al espacio extracelular para ingresar en la sangre y eliminarse con la orina.

9-18. Los NADH generados durante la glucólisis no ingresan en las mitocondrias

Hasta ahora hemos soslayado el destino de los NADH generados durante la glucólisis (cap. 9-6). A diferencia de los NADH formados en las mitocondrias, que como vimos rinden tres ATP cada uno, los de la glucólisis dan lugar a dos ATP. Este menor rendimiento energético se debe a que el NADH citosólico no puede ingresar en la mitocondria debido a que sus membranas son impermeables a aquél. Para que el NADH pueda ceder su energía, ingresan en la mitocondria sólo sus e^- , ya que no el propio NADH. Ello es posible porque ciertas moléculas citosólicas actúan como "lanzaderas". Estas, luego de captar a los e^- del NADH (las lanzaderas se reducen), los conducen a las mitocondrias, donde los transfieren a otra molécula (las lanzaderas se oxidan); retornan sin ellos al citosol para poder repetir la operación (fig. 9-16). Una de las lanzaderas más conocidas es el *glicerol 3-fosfato*, que entra en el espacio intermembranoso y se pone en contacto con la cara exterior de la membrana mitocondrial interna y, por intermedio de ésta, con un FAD, al que le cede los e^- . Se forma por lo tanto un $FADH_2$, que como sabemos se vincula con la cadena respiratoria a través de la ubiquinona (vimos que cuando los e^- ingresan por este transportador dan lugar a dos ATP en lugar de tres).

9-19. En presencia de oxígeno, por cada molécula de glucosa se generan 36 ATP

Para efectuar el cálculo de la energía ganada en unidades de ATP al cabo de la oxidación de una molécula de glucosa es necesario sumar la energía producida en el citosol durante la glucólisis a la gestada en las mitocondrias, en estas últimas tanto al formarse la acetil CoA a partir del piruvato como durante el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.

Durante la glucólisis se generan 4 moléculas de ATP. Debido a que se gastan 2, en esta etapa hay una ganancia neta de 2 ATP. Pero además se generan 2 NADH, que por ser citosólicos producen 2 ATP cada uno, 4 en total. Así, el aporte de la glucólisis es de 6 ATP, 2 generados directamente en el propio citosol y 4 en las mitocondrias a partir de los e^- suministrados por los 2 NADH a que da lugar la glucólisis.

Los dos piruvatos que se forman a partir de la glucólisis entran en la mitocondria, donde por descarboxilación oxidativa se convierten en otras tantas moléculas de acetil CoA. El proceso genera 2 NADH, uno por cada piruvato. Dado que la fosforilación oxidativa de cada NADH da lugar a 3 ATP, esta etapa rinde 6 ATP.

Cada una de las acetil CoA, en el ciclo de Krebs, genera 1 ATP, 3 NADH y 1 $FADH_2$, de modo que al cabo de las dos vueltas que se necesitan para metabolizar las dos acetil CoA surgen 2 ATP, 6 NADH y 2 $FADH_2$. Dado que la fosforilación oxidativa de cada NADH genera 3 ATP, y la de cada $FADH_2$, 2 ATP, a los 2 ATP surgidos de las dos vueltas del ciclo de Krebs deben sumárseles 18 ATP aportados por los 6 NADH más 4 ATP aportados por los 2 $FADH_2$, lo que hace un total de 24 ATP.

Sumados a los 6 ATP de la glucólisis más los 6 ATP de la descarboxilación oxidativa, la ganancia

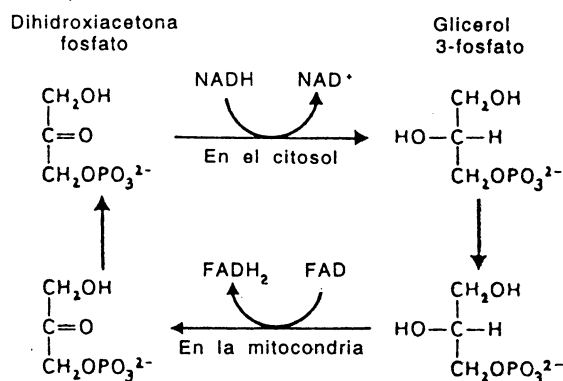


FIG. 9-16. Sistema de "lanzadera" para transportar a la mitocondria los electrones de los NADH generados durante la glucólisis.

neta por molécula de glucosa es de 36 ATP. Compárese esta producción con los exigüos 2 ATP generados en el citosol y se tendrá una idea de la importancia de las mitocondrias para aportar energía para el funcionamiento de las células consumidoras de oxígeno.

9-20. En las células musculares el piruvato puede convertirse en lactato

Las células musculares, cuando sobrepasan un determinado nivel de actividad, agotan el O_2 atmosférico que les llega por medio de los glóbulos rojos, situación por demás normal. Ante la falta de O_2 , el piruvato, en vez de convertirse en el grupo acetilo de la acetil CoA, se transforma en *lactato*. Este proceso metabólico se conoce con el nombre de fermentación láctica. Como es obvio, el ciclo de Krebs, y en consecuencia la fosforilación oxidativa, se omiten. El lactato acumulado en las células musculares pasa a la sangre, y por ésta al hígado. En los hepatocitos —vía piruvato— el lactato vuelve a convertirse en glucosa, que nuevamente utilizará la célula muscular si la demanda de energía lo exigiere.

9-21. En las mitocondrias de la grasa parda la energía generada por las oxidaciones se disipa en forma de calor

Si la energía protomotriz de los H^+ presentes en el espacio intermembranoso no se rescatara para formar ATP, los H^+ , al volver a la matriz mitocondrial, igual se unirían a los e^- y al O_2 para formar H_2O , pero la energía protomotriz, al cabo de la reacción, se convertiría en energía térmica, es decir, se disiparía como calor. Esto es lo que ocurre en las células adiposas de la llamada *grasa parda*, cuyas mitocondrias son incapaces de transferir la energía protomotriz al ATP. Ello se debe a que en la membrana interna de dichas mitocondrias existe una proteína transportadora de H^+ —denominada *termogenina*— que, al no poseer la función enzimática de la ATP sintetasa (porción F_1), permite el regreso de los H^+ a la matriz mitocondrial sin que su energía sea utilizada para formar ATP. En consecuencia, la energía protomotriz, al reaccionar los H^+ con los e^- y el O_2 atmosférico durante la formación de H_2O , se disipa como calor.

La grasa parda es un tejido que se encuentra en los recién nacidos, particularmente en la región interescapular. Si el niño nace en un medio ambiente muy frío, los triglicéridos depositados en las células de dicha grasa se degradan y generan calor en lugar de ATP. Como vemos, la grasa parda puede ser vital en el momento del nacimiento al permitir una rápida adaptación de los recién nacidos a las bajas temperaturas.

9-22. Las mitocondrias poseen otras funciones

Remoción de Ca^{2+} del citosol. Normalmente esta función está a cargo del retículo endoplasmático. No obstante, cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta en el citosol a niveles que pueden ser peligrosos para la célula, se pone en acción una Ca^{2+} ATPasa localizada en la membrana interna de las mitocondrias, que al bombear el Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial lo retira del citosol.

Síntesis de aminoácidos. A partir de determinadas moléculas intermediarias del ciclo de Krebs, las mitocondrias de los hepatocitos intervienen en la síntesis de algunos tipos de aminoácidos presentes en el organismo.

Síntesis de esteroides. En algunas células de la corteza suprarrenal, los ovarios y los testículos, las mitocondrias participan en la síntesis de diversos esteroides (función esteroidogénica). Para ello, el *colesterol* captado por las células debe ser transportado hacia las mitocondrias, donde, por acción de una enzima localizada en la membrana mitocondrial interna, se convierte en *pregnenolona*. La pregnenolona sale de la mitocondria e ingresa en el retículo endoplasmático (cap. 8-14). Allí continúa su metabolismo mediante diversas enzimas que actúan secuencialmente. En el caso de la corteza suprarrenal, dan lugar a *desoxicorticosterona*, *desoxicortisol* y al andrógeno *androstenediona*. Los dos primeros esteroides, luego de abandonar el retículo endoplasmático, regresan a las mitocondrias, donde, por acción de la 11β -hidroxilasa, la desoxicorticosterona se convierte en *corticosterona* y el desoxicortisol en *cortisol*. Estos glucocorticoides son producidos en las células de la zona fasciculada de la corteza suprarrenal. Posteriormente, en las células de la zona glomerulosa, por acción de la 18-hidroxilasa y la 18-hidroxiesteroide oxidasa, la corticosterona se convierte en el mineralocorticoide *aldosterona*. La mayor parte de los pasos metabólicos mencionados son oxidaciones, en cuyo transcurso una familia de citocromos presentes en la mitocondria —los citocromos P_{450} — actúan como aceptores de electrones.

REPRODUCCION DE LAS MITOCONDRIAS

9-23. Las mitocondrias se reproducen para reemplazar a las que desaparecen y su número se duplica antes de cada división celular

Como veremos en el capítulo 15, para que las células se puedan dividir todos sus componentes —incluidas las mitocondrias— deben previamente duplicarse. En las células que no se multiplican, o

que poseen interfases prolongadas, las mitocondrias envejecen y son degradadas por los autofagosomas; no obstante, su número permanece relativamente estable, debido a la formación de nuevas mitocondrias. Así, sea para su renovación o por necesidades derivadas de la proliferación celular, las mitocondrias deben estar dotadas de un mecanismo que les permita multiplicarse en cantidades adecuadas y en los momentos oportunos.

La reproducción de las mitocondrias no se produce como consecuencia de un ensamblaje espontáneo de los componentes que las integran sino por la división (*fisión*) de mitocondrias preexistentes, las cuales deben previamente duplicar su tamaño. En la figura 9-17 pueden observarse las sucesivas etapas de crecimiento, y al final, la división mitocondrial.

La división de las mitocondrias se produce durante todo el ciclo celular, tanto en la interfase como en la mitosis. No obstante, no todas las mitocondrias se multiplican; por ende, algunas deben dividirse repetidas veces durante el curso de un mismo ciclo celular a fin de compensar a las que omiten hacerlo.

9-24. Algunas proteínas mitocondriales son generadas en las propias mitocondrias

La mayor parte de los componentes con los cuales se construyen las mitocondrias provienen del citosol, en tanto unos pocos —dado que este orgánulo cuenta con los recursos para elaborarlos— se producen en su propio territorio. En efecto, la mitocondria posee varias copias de una misma molécula de ADN, a partir de la cual se transcriben 13 ARNm distintos (base para la síntesis de otras tantas proteínas), 22 ARNt y 2 clases de ARNr, uno correspondiente a la subunidad mayor de los ribosomas mitocondriales y el otro a la subunidad menor. Todas estas moléculas se encuentran en la matriz mitocondrial, hallándose las moléculas de ADN ancladas por algunos de sus puntos a la membrana interna del orgánulo (fig. 9-9).

Con la llegada desde el citosol de los correspondientes aminoácidos, en los ribosomas mitocondriales se sintetizan las siguientes 13 proteínas, la mayoría pertenecientes a la cadena respiratoria: 7 subunidades de la NADH deshidrogenasa, una del citocromo b, tres de la citocromo oxidasa, y dos subunidades de la ATP sintetasa.

9-25. El ADN mitocondrial es diferente del ADN nuclear

El ADN mitocondrial presenta las siguientes particularidades, que lo diferencian del ADN nuclear (figs. 9-17 y 9-18):

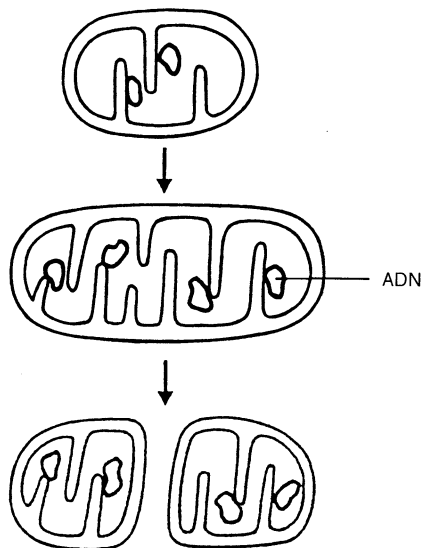


FIG. 9-17. Reproducción de las mitocondrias.

1. Es circular, carece de histonas y se replica a partir de un solo punto de origen.
2. Es muy pequeño. En casi todos los tipos celulares la suma de los ADN tomados de todas las mitocondrias representa no más del 1% del ADN nuclear.
3. Posee muy pocas y a la vez muy cortas secuencias no esenciales, es decir, que no codifican ninguna clase de ARN.
4. Genera 22 tipos de ARNt, en lugar de los 31 que transcribe el ADN nuclear.
5. Los dos tipos de ARNr que codifica (12S y 16S) dan lugar a ribosomas con un coeficiente de sedimentación de 55S, inferior al de los ribosomas citosólicos (80S) y al de los procariotas (70S). La síntesis de proteínas en los ribosomas mitocondriales es inhibida por varios antibióticos, como las tetraciclinas, el cloranfenicol y la eritromicina (cap. 13-17).
6. En su código genético existen cuatro codones cuyas instrucciones difieren de las de sus pares del ADN nuclear (cap. 11-4). Se trata de los codones AGA, AGG, AUA y UGA. En el ADN nuclear los dos primeros corresponden al aminoácido arginina, mientras que en el ADN mitocondrial se comportan como codones de terminación. El codón AUA en el ADN nuclear determina a la isoleucina, y en el ADN mitocondrial, a la metionina. El codón UGA en el genoma nuclear es un codón de terminación, y en el mitocondrial determina al triptófano.
7. Se transcriben sus dos cadenas. Casi todos los ARNm, 14 ARNt y los 2 ARNr residen en una de las cadenas, mientras que 8 ARNt y los restantes ARNm pertenecen a la otra.

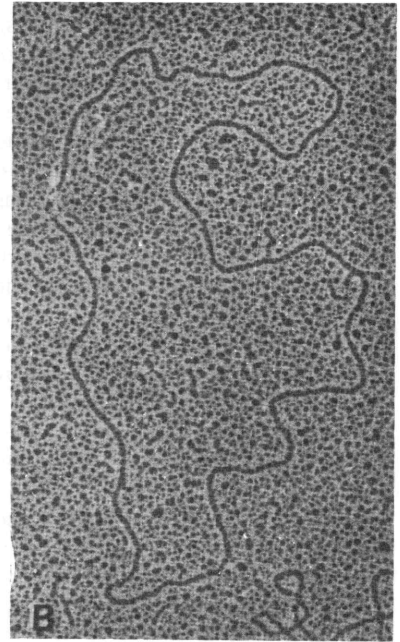
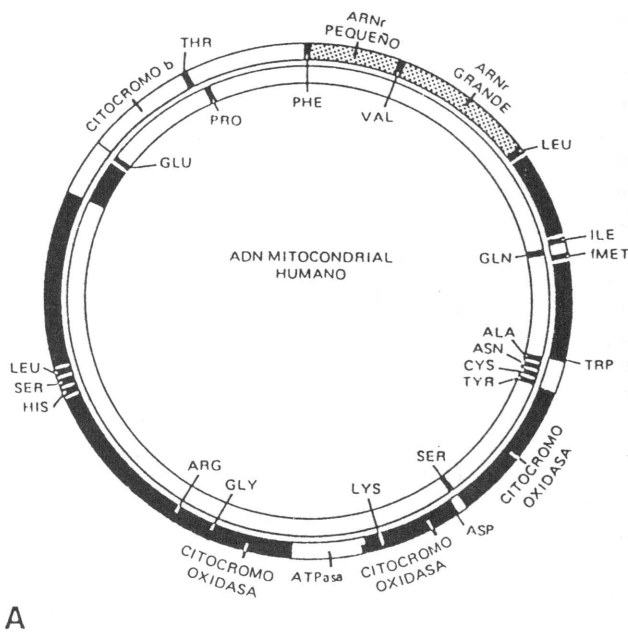


FIG. 9-18. A. ADN circular de la mitocondria humana en el que se representan sus dos cadenas, con los genes de los dos ARNr, los genes de los 22 ARNt y los genes de algunos de los 13 ARNm. **B.** ADN mitocondrial de una célula de rata observado con la técnica de extendido y sombreado metálico. (Cortesía de B. Stevens.)

8. Apenas las moléculas de ARN se sintetizan, son procesadas. Así, los ARN son seccionados en los puntos en que se unen los genes transcritos, y son degradadas sus partes no traducibles.

9. Las mitocondrias poseen *varias copias* de un mismo ADN, y no dos como el ADN nuclear. Pero lo más singular no es la diferencia en el número de copias sino que son heredadas enteramente de la madre, ya que, como se sabe, en el momento de la fecundación virtualmente todas las mitocondrias (y por ende las moléculas de ADN mitocondrial) son aportadas por el ovocito (cap. 16-19).

9-26. La síntesis de las proteínas mitocondriales requiere una adecuada coordinación

Aunque la mitocondria posee ADN, ARNm, ARNt y ribosomas propios, las proteínas que fabrica son muy pocas —13 en total—; por consiguiente, la mayor parte de las que necesita para su crecimiento y reproducción debe importarla desde el citosol. Dada esa doble procedencia, se requiere una perfecta coordinación entre las actividades de los genomas mitocondrial y nuclear para que todos los componentes de la mitocondria sean producidos en las proporciones adecuadas. Las proteínas importadas son producidas en los ribosomas citosólicos libres (no asociados al retículo endoplasmático). Entre las más importantes se encuentran las

del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa, las enzimas responsables del ciclo de Krebs, las que escinden a los ácidos grasos, muchas de las proteínas requeridas para la fosforilación oxidativa, las que se asocian a los ribosomas mitocondriales, la ADN polimerasa, la ARN polimerasa, las proteínas transmembranas que transportan iones y moléculas a través de la membrana interna, etcétera.

9-27. La incorporación de las proteínas a las membranas y a los compartimientos mitocondriales adecuados es el resultado de un proceso complejo

Conforme surgen de sus respectivos ribosomas, las proteínas mitocondriales producidas en el citosol se asocian con una proteína *chaperona* de la familia hsp70 (cap. 13-16), la cual mantiene a las moléculas proteicas desplegadas, condición necesaria para que logren ser conducidas hasta la mitocondria y puedan ser translocadas a través de sus membranas sin dificultad. La translocación es un proceso complejo, durante el cual las proteínas importadas se desprenden de la chaperona hsp70 citosólica y se asocian a una chaperona mitocondrial, también de la familia hsp70. Este proceso requiere energía, que es tomada del ATP. Las proteínas se liberan de la segunda chaperona hsp70 apenas arriban a la matriz mitocondrial, donde comienzan a plegarse. Para poder hacerlo necesitan asociarse a

otra chaperona —ésta perteneciente a la familia hsp60—, con cuya ayuda adquieren las estructuras secundarias y terciarias apropiadas.

Todas las proteínas importadas desde el citosol incluyen en el extremo amino de sus moléculas un *péptido señal* (cap. 13-15), compuesto por unas pocas decenas de aminoácidos (fig. 9-19). Dada la información contenida en el péptido señal, apenas las proteínas surgen de los ribosomas son conducidas hacia las mitocondrias, en cuyas membranas existen receptores para el péptido. Las proteínas

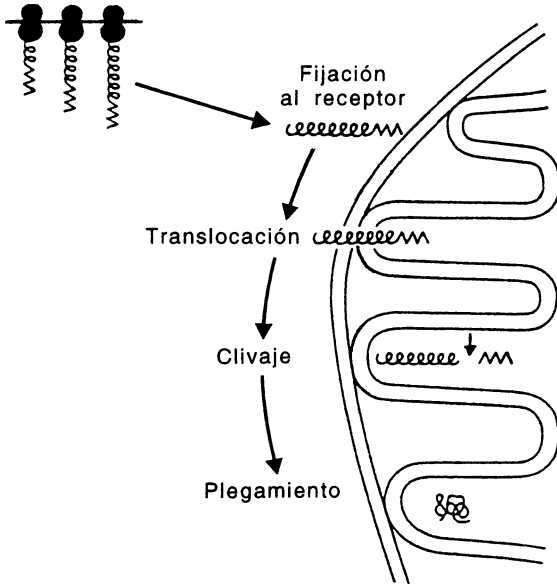


FIG. 9-19. Modo como se incorpora una proteína (elaborada en el citosol) a la matriz mitocondrial.

atraviesan las membranas e ingresan en la matriz mitocondrial. Como vimos, este pasaje requiere energía. A continuación una proteasa elimina el péptido señal de las proteínas, que pueden permanecer en la matriz, insertarse en la membrana interna o pasar al espacio intermembranoso. Sus destinos dependen de señales adicionales presentes en las proteínas, situadas al lado del péptido señal escindido.

9-28. Los fosfolípidos de las membranas mitocondriales provienen de la membrana del retículo endoplasmático

Además de proteínas, la génesis de nuevas mitocondrias requiere lípidos, que se incorporan mayormente a la bicapa lipídica de sus membranas. Como ocurre con las otras membranas de la célula, los fosfolípidos son provistos por la membrana del retículo endoplasmático, donde se gestan.

Para tomarlos del retículo endoplasmático, las mitocondrias recurren a *proteínas intercambiadoras*, que los sustraen de la membrana de aquél y los descargan en las membranas mitocondriales de la forma que se ilustra en la figura 9-20. Además, una vez importados, algunos fosfolípidos de la membrana mitocondrial interna experimentan modificaciones, como la unión de dos de ellos entre sí para dar lugar al difosfatidilglicerol (cardiolipina).

9-29. Probablemente las mitocondrias deriven de bacterias aeróbicas

Vimos que las mitocondrias se reproducen por *fisión binaria*, como las bacterias. Esta no es la úni-

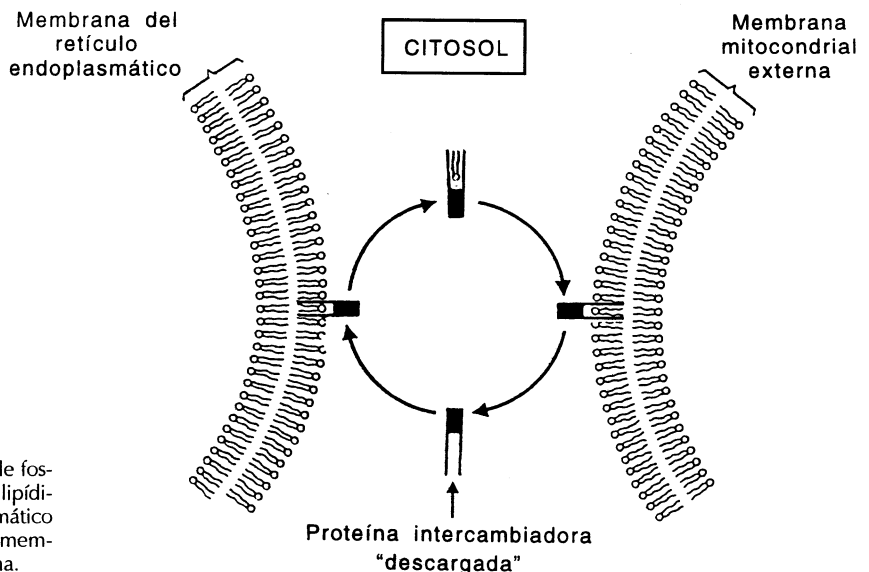


FIG. 9-20. Transferencia de fosfolípidos desde la bicapa lipídica del retículo endoplasmático a la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial externa.

ca semejanza con los procariotas. También se parecen en sus formas y medidas, y porque poseen diversas estructuras biomoleculares comunes. Tales semejanzas han llevado a pensar que las mitocondrias son un producto evolutivo de las bacterias. Esta teoría se basa en otros supuestos. Así, se cree que las primeras células eucariotas eran anaeróbicas, y que cuando la atmósfera terrestre se hizo rica en oxígeno incorporaron en sus citoplasmas ciertas bacterias aeróbicas que, tras sucesivos cambios

adaptativos, se convirtieron en las actuales mitocondrias. La simbiosis les permitió a las células eucariotas aprovechar el oxígeno atmosférico, con el cual comenzaron a producir mucha mayor energía a partir de la misma cantidad de alimentos. Paralelamente, la membrana plasmática quedó eximida de realizar procesos energéticos y pudo concentrarse en otras actividades, como controlar la transferencia de solutos, regular la entrada y salida de macromoléculas, recibir y emitir señales, etcétera.

PEROXISOMAS

9-30. *Los peroxisomas contienen enzimas oxidativas*

Los peroxisomas son organoides presentes en todos los tipos celulares, de forma ovoide y limitados por una sola membrana (fig. 9-21). Poseen un diámetro medio de 0,6 μm , y su número varía entre 70 y 100 por célula, aunque en las células hepáticas y renales suelen ser mucho más numerosos. Los peroxisomas contienen *enzimas oxidativas*, y se les dio ese nombre porque intervienen en la formación y descomposición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

En conjunto, las enzimas halladas en los peroxisomas son cerca de 40. Según la enzima o el conjunto de enzimas presentes en su interior, existen muchas clases de peroxisomas, y cada tipo celular contiene una determinada clase o una variedad particular de enzimas. Entre las más comunes se encuentran la *catalasa*, la *D-aminoácido oxidasa* y

la *urato oxidasa*. Los peroxisomas que contienen urato oxidasa exhiben en su matriz un pequeño cuerpo cristalino integrado por múltiples cristallitos.

Con excepción de la catalasa —que degrada al H_2O_2 en H_2O y O_2 —, las restantes enzimas oxidan sustratos específicos, por ejemplo, ácido úrico, uratos, oxalacetatos, purinas (adenina, guanina), aminoácidos, ácidos grasos, etc. La oxidación de los ácidos grasos es llevada a cabo por las enzimas *acil CoA oxidasa*, *enol CoA hidratasa*, *3-hidroxiacil CoA oxidasa* y *β -cetoacil CoA tiolasa*.

A diferencia de lo que ocurre en las mitocondrias, donde las oxidaciones producen energía química (ATP), en los peroxisomas las oxidaciones suelen generar energía térmica. No obstante, la *oxidación de los ácidos grasos* da lugar a la formación de energía química, ya que estos ácidos se convierten en moléculas de acetil CoA, las cuales pasan a las mitocondrias e ingresan en el ciclo de Krebs.

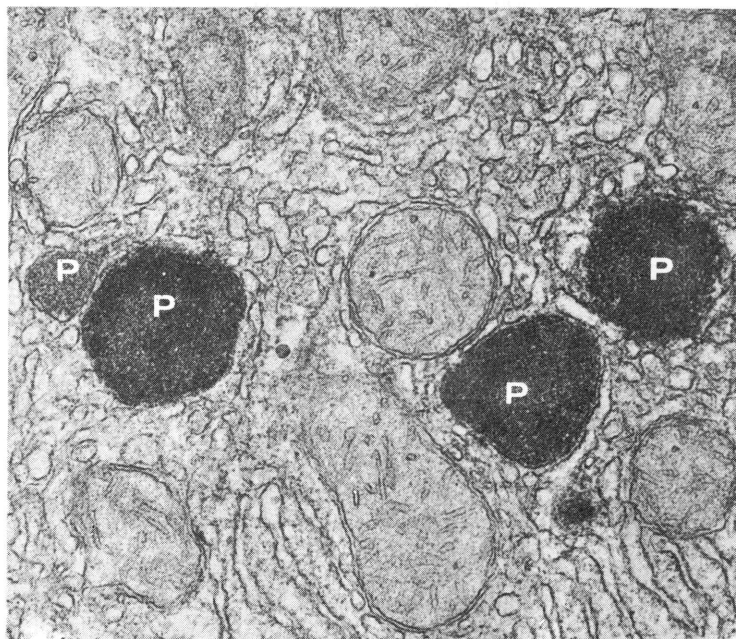
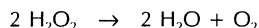


FIG. 9-21. Micrografía electrónica de una célula hepática coloreada inmunocitoquímicamente para la localización de la catalasa en los peroxisomas. Se observan varias mitocondrias. 30.000 $\times$. (Cortesía de H. F. Fahimi y S. Yokota.)

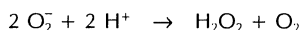
9-31. En los peroxisomas se genera H_2O_2 , que es neutralizado por la catalasa

La oxidación de sustratos en los peroxisomas tiene como consecuencia la producción de H_2O_2 , una molécula sumamente tóxica para la célula. En la sección anterior vimos que la enzima encargada de neutralizar al H_2O_2 es la *catalasa*; lo hace mediante la siguiente reacción:



9-32. La catalasa también degrada al H_2O_2 producido fuera de los peroxisomas

La catalasa no sólo degrada al H_2O_2 producido en los peroxisomas sino también al que se genera en otros puntos de la célula, particularmente en las mitocondrias, el retículo endoplasmático y el citosol. En estos sitios las oxidaciones dan lugar a pequeñas cantidades de *aniones superóxido* (O_2^-), comúnmente conocidos con el nombre de radicales libres. Estos radicales son muy reactivos, por lo que una enzima —la *superóxido dismutasa*— se encarga de eliminarlos mediante la siguiente reacción:

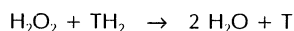


A su turno, este H_2O_2 pasa a los peroxisomas, donde es convertido en H_2O y O_2 por acción de la catalasa.

Se sospecha que el anión superóxido produce mutaciones génicas y alteraciones en la bicapa lipídica de las membranas celulares, lo que podría acelerar el envejecimiento orgánico y facilitar la aparición de cuadros cancerígenos.

9-33. La catalasa utiliza al H_2O_2 para neutralizar sustancias tóxicas

En las células hepáticas y renales la catalasa actúa también como una enzima destoxicificante. Para ello, ante la presencia de ciertos tóxicos, en lugar de convertir al H_2O_2 en H_2O y O_2 , utiliza al H_2O_2 para oxidarlos y así neutralizar su toxicidad. Ejemplos de sustancias tóxicas eliminadas por este mecanismo son los fenoles, el formaldehído, el ácido fórmico y el etanol. La reacción puede expresarse mediante la siguiente ecuación:



La sigla TH_2 simboliza a la sustancia tóxica, y la T a la misma sustancia luego de su oxidación. Aunque parcialmente, el etanol ingerido con las bebidas alcohólicas se neutraliza mediante este mecanismo, por el cual es oxidado a acetaldehído, exento de toxicidad.

9-34. Los peroxisomas se reproducen por fisión binaria

Los peroxisomas se multiplican por *fisión binaria* —por lo tanto, a partir de peroxisomas preexistentes—, como lo hacen las mitocondrias. En consecuencia, su masa debe duplicarse previamente. La bicapa lipídica de la membrana del peroxisoma crece mediante el agregado de fosfolípidos, que son extraídos del retículo endoplasmático liso mediante *proteínas intercambiadoras* (fig. 9-20). Por su parte, las proteínas que se incorporan a la membrana o a la matriz del organoide provienen de ribosomas libres en el citosol. Son conducidas selectivamente a los peroxisomas debido a que exhiben —cerca del extremo carboxilo de sus moléculas— un *péptido señal* específico compuesto por tres aminoácidos, reconocido por un receptor proteico situado en la membrana del organoide (cap. 13-15). Se cree que los peroxisomas tienen una vida media de 5 a 6 días, al cabo de los cuales son destruidos por medio de autofagosomas.

La mutación de un gen que codifica la síntesis de una proteína perteneciente a la membrana de los peroxisomas, involucrada aparentemente en la incorporación de las enzimas oxidativas a la matriz, genera un cuadro llamado *síndrome de Zellweger*, caracterizado por la presencia de peroxisomas “vacíos” en las células de los pacientes, quienes mueren antes del primer año de vida.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson S., Barrel B., Sanger F. et al. (1981) Sequence and organization of the mitochondrial genome. *Nature* 290: 465.
- Attardi G. et al. (1981) Organization and expression of genetic information in human mitochondrial DNA. *Int. Cell Biology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Attardi G. and Schatz G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:289.
- Babcock G. T. and Wikström M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356:301.
- Bereiter-Hahn J. (1990) Behavior of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* 122:1.
- Bianchet M. et al. (1991) Mitochondrial ATP synthase. Quaternary structure of the F_1 moiety at 3.6 Å determined by X-ray diffraction analysis. *J. Biol. Chem.* 266:21197.
- Borst P. (1981) The biogenesis of mitochondria in yeast and other primitive eukaryotes. *Int. Cell Biology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Borst P. (1983) Animal peroxisomes (microbodies) lipid biosynthesis and the Zellweger syndrome. *TIBS* 8:269.
- Boyer P. D. (1989) A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. *FASEB J.* 3:2164.
- Boyer P. D., Chance B., Ernster L., Mitchell P., Racker E. and Slater E. C. (1977) Oxidation, phosphorylation and photophosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 46:995.
- Bücher T., Neupert W., Sebald W. and Werners S. (1977) Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria. North-Holland Publishing, Amsterdam.

- Bygrave F. L. (1978) Mitochondria and the control of intracellular calcium. *Biol. Rev.* 53:43.
- Capaldi R. A. (1982) Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 694: 291.
- Capaldi R. A. (1990) Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* 59:569.
- Chance B. (1972) The nature of electron transfer and energy coupling reactions. *FEBS Lett.* 23:1.
- Clayton D. A. (1991) Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:453.
- De Pierre J. W. and Ernster L. (1977) Enzyme topology of intracellular membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 46:201.
- Erecinska M. and Wilson D. F. (1978) Cytochrome-c-oxidase: A synopsis. *Arch. Biochem. Biophys.* 188:1.
- Ernster L. (1977) Chemical and chemiosmotic aspects of electron transport-linked phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 46:981.
- Ferguson S. J. and Sorgato M. C. (1982) Proton electrochemical gradients and energy transduction processes. *Annu. Rev. Biochem.* 51:185.
- Frederick J. F. (1982) Origin and Evolution of Eukaryotic Intracellular Organelles. *Ann. New York Acad. Sci.*, Vol. 361.
- Glick B. S., Beasley E. M. and Schatz G. (1992) Protein sorting in mitochondria. *TIBS* 17:453.
- Gray M. W. (1989) Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:25.
- Grivell L. A. (1983) Mitochondrial DNA. *Sci. Am.* 248 (3):60.
- Hackenbrock C. L. R. (1981) Lateral diffusion and electron-transfer in the mitochondrial inner membrane. *Trends Biochem. Sci.* 6:151.
- Hatefi Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 45: 1015.
- Hay R., Böhni P. and Gasser S. (1984) How mitochondria import proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 779:65.
- Hinkle P. C. and McCarty R. E. (1978) How cells make ATP. *Sci. Am.* 238:104.
- Hinkle P. C., Kumar M. A., Resetar A. and Harris D. L. (1991) Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 54:1015.
- Hofhaus G., Weiss H. and Leonard K. (1991) Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *J. Mol. Biol.* 221:1027.
- Kindl H. (1982) The biosynthesis of microbodies (peroxisomes and glyoxysomes). *Int. Rev. Cytol.* 80:193.
- Klingenberg M. (1990) Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *TIBS* 15:108.
- Klingenberg M., Riccio P., Aguila H., Buchanan B. B. and Grebe K. (1976) Mechanism of carrier transport and ADP, ATP carrier. In: *The Structural Basis of Membrane Function*. Academic Press, New York.
- Lehninger A. L., Nelson D. L. and Cox M. M. (1993) *Principles of Biochemistry*, 2nd Ed. Worth, New York.
- Linnane A. W. and Nagley P. (1978) Structural mapping of mitochondrial DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 187:277.
- Mahler H. R. and Raft R. A. (1975) The evolutionary origin of the mitochondrion: A nonsymbiotic model. *Int. Rev. Cytol.* 43:2.
- Margulis L. (1971) Cell organelles such as mitochondria may have once been free living organisms. *Sci. Am.* 225:48.
- Masters C. and Holmes R. (1977) Peroxisomes: New aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol. Rev.* 57:816.
- Mitchell P. (1977) A commentary on alternative hypotheses of protonic coupling. *FEBS Lett.* 78:1.
- Neupert W. and Schatz G. (1981) How proteins are transported into mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 6:1.
- Nicholls D. G. and Rial E. (1984) Brown-fat mitochondria. *TIBS* 9:489.
- O'Brien T. W. (1977) Transcription and translation in mitochondria. In: *International Cell Biology*. Rockefeller University Press, New York.
- Saccone C. and Quagliariello E. (1975) Biochemical studies on mitochondrial transcription and translation. *Int. Rev. Cytol.* 43:125.
- Schatz G. and Butow R. A. (1983) How are proteins imported into mitochondria? *Cell* 32:316.
- Sjöstrand F. S. (1978) The structure of mitochondrial membranes: A new concept. *J. Ultrastruct. Res.* 64:217.
- Slater E. C. (1972) Mechanism of energy conservation. In: *Mitochondrial Biomembranes*. North-Holland Publishing, Amsterdam.
- Srere P. A. (1982) The structure of the mitochondrial inner membrane-matrix compartment. *TIBS* 5:375.
- Stryer L. (1988) *Biochemistry*, 3rd Ed. W. H. Freeman, New York.
- Tager J. M. et al. (1983) Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett.* 151:1.
- Tzagoloff A. (1982) *Mitochondria Cellular Organelles*. Plenum press, New York.
- Wallace D. C. (1992) Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 61:1175.
- Wikström M. (1989) Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping. *Nature* 338:776.
- Yaffe M. and Schatz G. (1984) The future of mitochondrial research. *Trends Biochem. Sci.* 9:179.

10/Núcleo interfásico

José Hib

10-1. El núcleo es uno de los compartimientos esenciales de la célula eucariota

La presencia del núcleo es una de las características que distingue a las células eucariotas. El núcleo ocupa alrededor del 10% del volumen total de la célula y en él se halla confinado el ADN (excepto el mitocondrial). Está delimitado por la *envoltura nuclear*, compuesta por dos membranas concéntricas —una interna y otra externa— que se continúan con el sistema de membranas del retículo endoplasmático. Ambas membranas aparecen perforadas por *poros*, a través de los cuales el interior del núcleo se comunica con el citosol. La envoltura nuclear se halla reforzada por dos armazones de filamentos intermedios, uno adosado a su superficie interna —la *lámina nuclear*— y otro situado sobre la cara citosólica de la membrana externa (figs. 10-1 y 10-2).

En el compartimiento nuclear se localizan:

1. Cuarenta y seis *cromosomas*, cada uno formado por una larga molécula de ADN combinada con varias proteínas, particularmente con las proteínas básicas llamadas *histonas*.

2. Los distintos tipos de ARN (*ARNm*, *ARNt*, *ARNr*), que se sintetizan en el núcleo al ser transcritos los sectores del ADN correspondientes a sus genes. Las moléculas de ARN salen hacia el citosol por los poros de la envoltura nuclear. Debe señalarse que antes de abandonar el núcleo los ARN experimentan una serie de cambios —por ejemplo, cortes y empalmes en sus moléculas— conocidos como *procesamientos del ARN*. Respecto de los ARNr, se transcriben en sectores particulares de ciertos cromosomas. El ADN de esos sectores y el ARNr recién sintetizado componen una estructura nuclear visible con el microscopio óptico, llamada *nucléolo*.

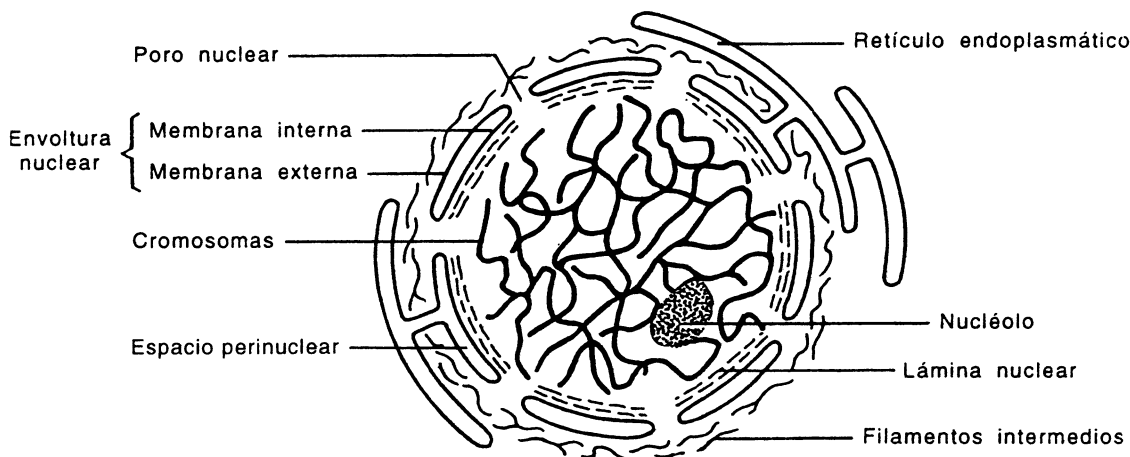


FIG. 10-1. Representación gráfica del núcleo celular. Obsérvense la lámina nuclear (constituida por filamentos intermedios llamados láminas) y la envoltura nuclear como parte integrante del sistema de endomembranas.

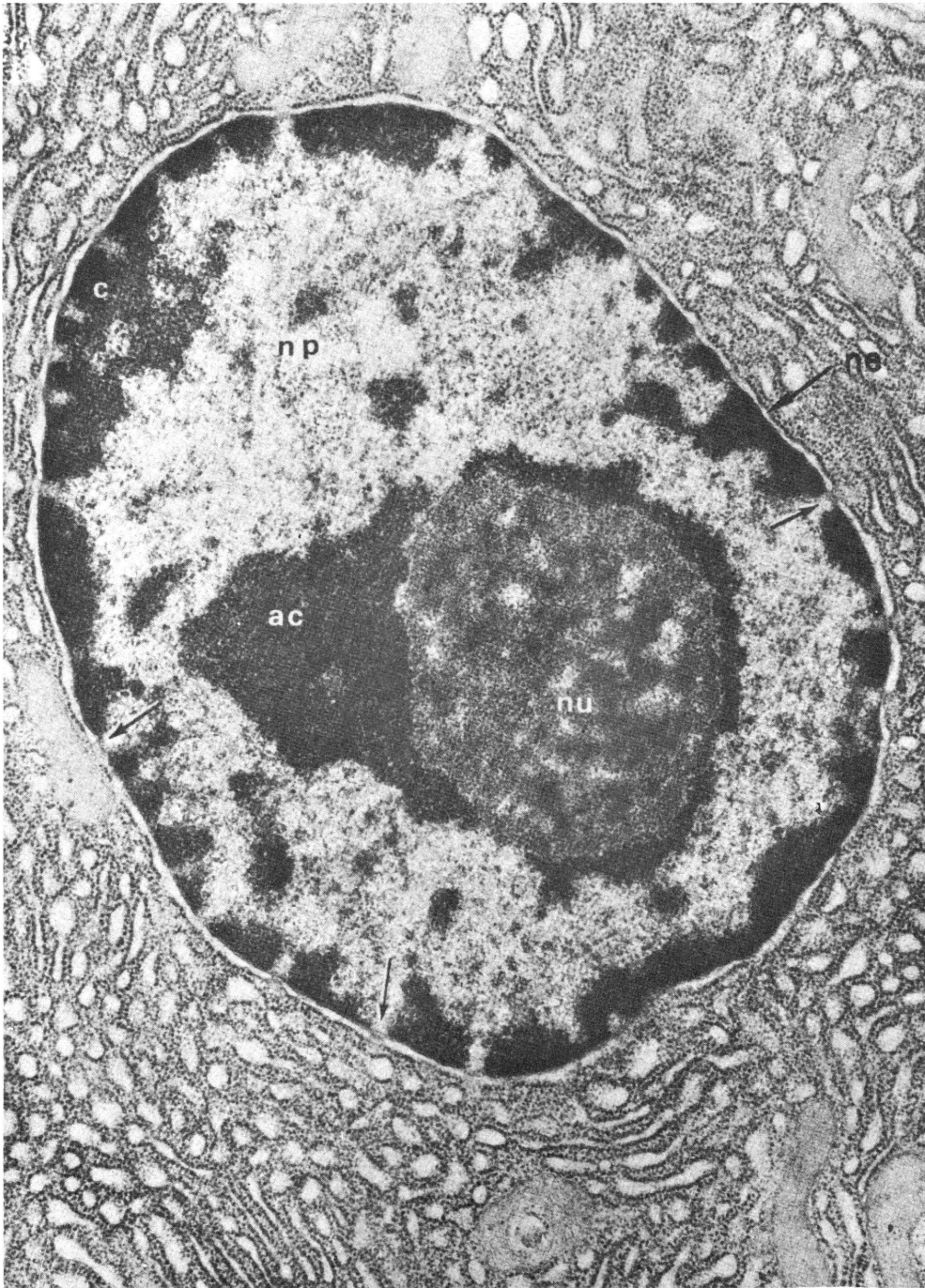


FIG. 10-2. Micrografía electrónica de una célula pancreática de ratón. Parte de la cromatina (c) se encuentra junto a la cara interna de la envoltura nuclear (nc), excepto a nivel de los poros nucleares (flechas). np, nucleoplasma; nu, nucléolo; ac, cromatina asociada al nucléolo. Obsérvese la cara externa de la envoltura nuclear cubierta de ribosomas. 24.000 $\times$. (Cortesía de J. André.)

3. Diversas proteínas, entre otras la ADN polimerasa, las ARN polimerasas, las proteínas ribosómicas, las que regulan la actividad de los genes, las que participan en el procesamiento del ARN, etc.

Todas estas proteínas —incluidas las histonas de los cromosomas— son fabricadas en el citosol e ingresan en el núcleo a través de los poros de la envoltura nuclear.

4. Los elementos mencionados en los puntos anteriores se hallan dispersos en la *matriz nuclear* (*nucleoplasma*), cuya composición es prácticamente desconocida.

Los motivos por los cuales las moléculas de ADN han sido confinadas en un compartimiento —el núcleo—, aislándolas de los componentes citoplasmáticos, serían: 1) proteger al ADN de posibles colisiones generadas durante los desplazamientos de las proteínas motoras asociadas a los microtúbulos y a los filamentos de actina, esenciales para transportar a los elementos citoplasmáticos; 2) poder completar el procesamiento de los ARNm antes que se inicie la síntesis proteica, ya que ésta debe producirse a partir de ARNm plenamente formados.

ENVOLTURA NUCLEAR

10-2. La envoltura nuclear está compuesta por dos membranas atravesadas por poros

Hemos dicho que la envoltura nuclear está compuesta por *dos membranas* concéntricas. Estas, como se aprecia en la figura 10-1, se unen a nivel de los *poros*, los cuales se hallan distribuidos más o menos regularmente por toda la superficie de la envoltura. La membrana externa de la envoltura nuclear se continúa con la membrana del retículo endoplasmático. Más aún, comúnmente su cara citosólica aparece asociada a un gran número de ribosomas, y el espacio entre la membrana externa y la membrana interna —conocido con el nombre de *espacio perinuclear*— se continúa con la luz del retículo endoplasmático. Así como muchas proteínas elaboradas en los ribosomas asociados al retículo endoplasmático se vuelcan en el interior de este último, las elaboradas en los ribosomas de la envoltura nuclear se vuelcan en el espacio perinuclear.

La membrana nuclear interna se halla sostenida por la *lámina nuclear*, que es un delgado enrejado de filamentos intermedios dispuestos en las más variadas direcciones. La lámina nuclear, cuyo espesor es de 10 a 20 nm, se halla interrumpida sólo a la altura de los poros (figs. 10-1 y 10-3). Sus filamentos intermedios, compuestos por proteínas llamadas *láminas*, al ensamblarse forman una estructura bidimensional, a diferencia de los filamentos intermedios de queratina, desmina, vimentina, etc., que en el citosol dan lugar a estructuras tridimensionales. Algunas proteínas transmembranosas presentes en la bicapa lipídica de la membrana nuclear interna sirven como puntos de anclaje para los filamentos laminares. La lámina nuclear establece la forma —generalmente esférica— de la envoltura nuclear, y le otorga cierta rigidez. Como ocurre con

la envoltura nuclear, la lámina nuclear se desarma al comenzar la mitosis y se vuelve a armar —en las dos células hijas— cuando ésta concluye, con la consiguiente reaparición de la envoltura.

10-3. Los poros de la envoltura nuclear son estructuras complejas

Los 3.000 a 4.000 poros presentes en la envoltura de los núcleos celulares son mucho más que simples perforaciones en las que la membrana interna se continúa con la membrana externa. En efecto, en ellos un conjunto de proteínas forma una estructura llamada *complejo del poro*, que está integrada por los siguientes componentes (figs. 10-3 y 10-4):

1. La pared del complejo, con forma de cilindro hueco abierto en sus dos extremos, está compuesta por *ocho columnas proteicas* que atraviesan la envoltura nuclear de lado a lado. En conjunto, los extremos citosólicos de dichas columnas componen un anillo a nivel de la membrana externa. Un anillo similar se forma en el lado del poro que da al interior del núcleo, a nivel de la membrana interna. Debe señalarse que los filamentos intermedios de la lámina nuclear se hallan ligados al complejo del poro por medio del anillo interno y le confieren rigidez.

2. Proteínas transmembranosas amarran las columnas proteicas a la bicapa lipídica de la envoltura nuclear. Así, por uno de sus extremos cada una de esas proteínas se adhiere a la columna, su dominio central atraviesa la bicapa y el extremo opuesto queda libre en la luz del espacio perinuclear.

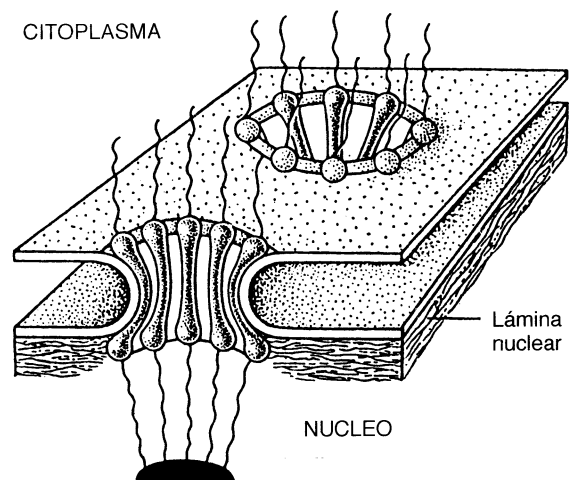


FIG. 10-3. Esquema de la envoltura nuclear, formada por dos bicapas lipídicas que se continúan a nivel de los poros nucleares. Los complejos del poro presentan simetría radial octogonal. La lámina nuclear cubre la cara interna de la envoltura, salvo en los poros. (De W. W. Franke et al., modificado.)

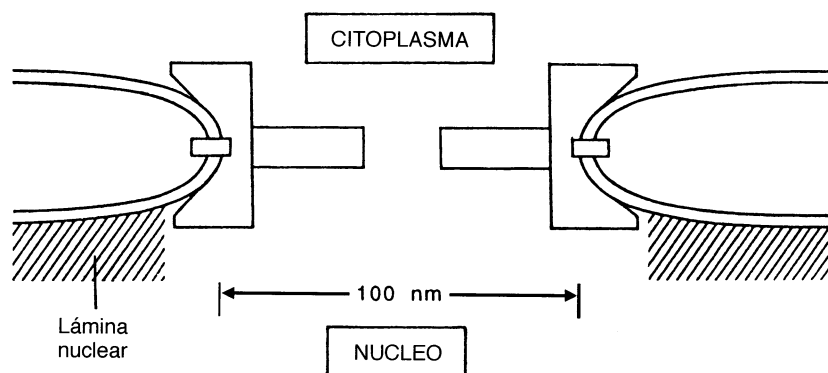


FIG. 10-4. Esquema del complejo del poro con sus distintos componentes.

3. El complejo muestra además una serie de *rayos* que nacen en la cara interior de las columnas y se proyectan hacia el centro del poro, por lo que reducen su diámetro real.

4. Finalmente, de los anillos externo e interno nacen *fibrillas* que se proyectan hacia el citosol y el interior del núcleo, respectivamente. Las fibrillas que dan hacia el núcleo se unen por sus extremos, lo cual genera una estructura con aspecto de jaula.

El diámetro total del complejo del poro es de unos 100 nm y su espesor de alrededor de 30 nm. Sin embargo, sus distintos componentes convierten al poro en un canal cilíndrico de apenas 9 nm de diámetro, ubicado en el centro del complejo. A través de él pasan iones y moléculas de pequeño y gran tamaño, ya sea desde el núcleo hacia el citosol o en dirección opuesta. Los iones y las moléculas pequeñas son transferidos en forma pasiva, sin gasto de energía. En cambio, las macromoléculas —por ejemplo las proteínas— para poder pasar deben antes inducir la dilatación del poro. La energía requerida para que tenga lugar este singular transporte activo es tomada del ATP. Como vemos, el complejo del poro se comporta como un diafragma, que se abre o cierra de acuerdo con las dimensiones de las moléculas que deben atravesarlo.

10-4. El pasaje de macromoléculas a través del complejo del poro es regulado

La entrada de proteínas al núcleo se realiza por un mecanismo que autoriza el pasaje sólo de las adecuadas. En efecto, las proteínas destinadas al núcleo —producidas en ribosomas que se hallan libres en el citosol— emanan de éstos con un *péptido señal* —una secuencia específica de unos pocos aminoácidos— (cap. 13-15) que es reconocido por algún componente en el lado citosólico del complejo del poro, probablemente las fibrillas nacidas en su anillo externo. El péptido señal conduce a las proteínas hacia el centro del complejo, al que atraviesan previo agrandamiento del poro, que de 9 nm pasa a tener unos 25 nm de diámetro. Así,

es el péptido señal el que define la apertura del diafragma, lo cual, como vimos, es un proceso que requiere energía. A diferencia de las proteínas que ingresan en las mitocondrias y los peroxisomas, las destinadas al núcleo se pliegan apenas surgen de los ribosomas y en ese estado atraviesan los poros de la envoltura nuclear. Más aún, ya plegadas, estas proteínas deben ligarse a otras residentes en el citosol, llamadas *nucleoporinas* o *importinas*, que las conducen a la superficie de la envoltura nuclear y las ayudan a atravesar el poro.

Algunas proteínas —por ejemplo, las reguladoras de la actividad de los genes—, debido a que tienen que ser producidas con cierta antelación, una vez emanadas de los ribosomas son retenidas en el citosol hasta la llegada de las señales que les ordenen ingresar al núcleo. La retención tiene lugar al unírseles proteínas *chaperonas* de la familia hsp90 (cap. 13-16). Precisamente, dichas señales provocan la separación de las chaperonas, tras lo cual las proteínas pueden ingresar al núcleo.

Así como las proteínas elaboradas en el citosol dependen de un péptido señal para ingresar en el núcleo, las que deben regresar, lo mismo que las moléculas de ARN sintetizadas en el núcleo, también dependen de señales específicas para atravesar los poros de la envoltura nuclear y salir hacia el citosol. Por ejemplo, los ARNm pueden abandonar el núcleo si han completado su procesamiento, mientras que los ARNr pueden hacerlo luego de ensamblarse con determinadas proteínas, como se verá en el capítulo 12-21.

CROMOSOMAS

10-5. El material con que están formados los cromosomas es la cromatina

Cada cromosoma está constituido por una larguísima molécula de ADN, asociada a diversas proteínas. Según de qué cromosoma se trate, tal molécula puede contener entre 50 y 250 millones de pares de bases. Las proteínas asociadas al ADN se

clasifican en dos grandes categorías. Unas se conocen con el nombre de *histonas*. Las otras, que integran un grupo heterogéneo formado por diversas clases de polipéptidos, se denominan *no histónicas*. El complejo formado por ADN, histonas y proteínas no histónicas se llama *cromatina*. La cromatina, entonces, es el material de que están compuestos los cromosomas.

10-6. Las moléculas de ADN de los cromosomas exhiben un centrómero, dos telómeros y múltiples orígenes de replicación

En cada cromosoma existen determinadas estructuras, y en su ADN ciertas secuencias de nucleótidos, que son imprescindibles para la replicación, es decir, para la duplicación que experimentan la molécula de ADN y las proteínas asociadas poco antes de la división celular. Son las siguientes (fig. 10-5):

1. El **centrómero**, que participa en el reparto a las células hijas de las dos copias cromosómicas generadas como consecuencia de la replicación del ADN (cap. 15-15).

2. Los **telómeros**, que corresponden a los extremos de los cromosomas. Allí el ADN posee una secuencia de nucleótidos especial, que determina el modo singular como se replica (cap. 14-9).

3. Como veremos en el capítulo 14-4, la enorme longitud de los cromosomas exige que la replicación se inicie en muchísimos puntos del ADN a la vez, a fin de que su síntesis se logre en un tiempo adecuado. Cada uno de esos puntos se denomina **origen de replicación**, y en ellos el ADN exhibe secuencias de nucleótidos especiales. Más aún, todos los orígenes de replicación tienen en común secuencias conservadas de alrededor de una docena de pares de nucleótidos llamadas ARS (por *autonomous replication sequence*).

Por otro lado, la capacidad o incapacidad funcional del ADN, es decir, su aptitud o incompetencia para generar moléculas de ARN (proceso conocido con el nombre de transcripción del ADN), depende de la secuencia de sus nucleótidos. Así, en algunos sectores el ADN exhibe secuencias de nucleótidos funcionalmente aptas para transcribir (genes), mientras en otros presenta secuencias aparentemente prescindibles, por lo menos a la luz de los conocimientos actuales.

10-7. Los cromosomas poseen secuencias de ADN únicas y secuencias de ADN repetidas

En las moléculas de ADN se halla depositada la información genética de la célula. Dado que todas las células poseen conjuntos virtualmente idénticos de tales moléculas, puede decirse que en ellas se

encuentra la información genética que rige el destino de todo el organismo, desde la que modula los acontecimientos biológicos que tienen que ver con su desarrollo embriológico hasta la que gobierna su crecimiento, diferenciación y funciones, incluida su predisposición o inmunidad a determinadas enfermedades.

La totalidad de la información genética depositada en las moléculas de ADN lleva el nombre de **genoma**. El 75% del ADN se halla representado por secuencias singulares (copias únicas) de nucleótidos y secuencias que se hallan una o pocas veces repetidas. En este sector del ADN se encuentran las secuencias de nucleótidos funcionalmente activas, es decir, los genes. Estos representan una pequeña parte del ADN —alrededor del 13% de ese 75%—, lo que equivale al 10% de todo el genoma. Precisamente, uno de los mayores desafíos para los biólogos moleculares es descifrar las funciones del ADN ajeno a los genes.

El 25% restante del ADN se halla representado por secuencias de nucleótidos altamente repetidas. Sus funciones se desconocen, aunque no se descarta que desempeñen algún papel en el mantenimiento de la estructura de los cromosomas.

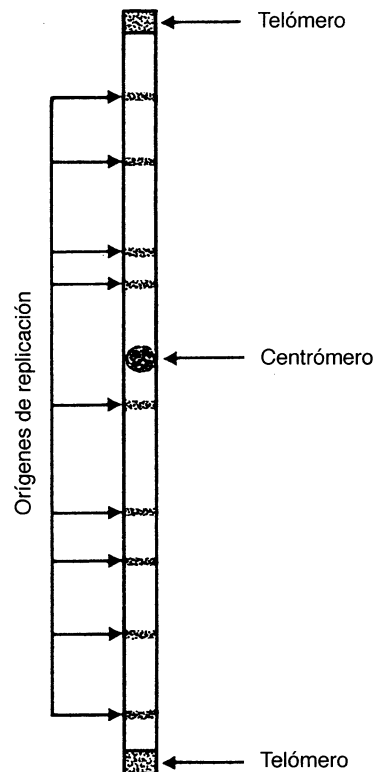


FIG. 10-5. Representación esquemática de un cromosoma, que muestra el centrómero, los telómeros y algunos orígenes de replicación.

A esta categoría pertenecen los llamados *ADN satélites*, compuestos por tandas de secuencias repetidas de nucleótidos. Según de qué ADN satélite se trate, varía tanto el largo de cada secuencia como el número de secuencias que se repiten en cada tanda. El ADN satélite más conspicuo se localiza en la cromatina de los centrómeros, y por lo tanto en todos los cromosomas. En dicha cromatina se acaba de descubrir una secuencia repetida de 171 pares de bases, a la que se le ha dado el nombre de *secuencia alfoide*; existe cierta variabilidad, de un cromosoma a otro, en tal secuencia. Otros ADN satélites se hallan en el brazo largo del cromosoma Y y en la cromatina aledaña a los centrómeros de los cromosomas 1, 3, 9, 16 y 19 (más adelante mencionaremos el significado de la numeración de los cromosomas).

Otro grupo de secuencias repetidas de nucleótidos comprende a los llamados *minisatélites*; son bastante más cortas que las de los satélites y se hallan dispersas en todos los cromosomas.

Finalmente, existen varias familias de ADN repetitivo cuyas copias no están juntas o agrupadas sino dispersas a lo largo de los cromosomas. La más estudiada es la familia *Alu*, a cuyas secuencias se les atribuye un significado funcional. Así, algunos creen que corresponden a las antes mencionadas secuencias ARS de los orígenes de replicación —de las cuales nos volveremos a ocupar en el capítulo 14-4—, mientras otros consideran que las secuencias repetidas *Alu* codifican el pequeño ARNsc asociado a la partícula PRS (cap. 11-3).

10-8. Las células humanas somáticas poseen 46 cromosomas

Las células humanas somáticas poseen 46 cromosomas —es decir, 46 moléculas de ADN—, divididos en 22 pares de autosomas más un par de cromosomas sexuales (fig. 10-14). Los dos miembros del par sexual son idénticos entre sí en la mujer, pero distintos en el varón. En forma preliminar, puede decirse que en cada célula existen dos juegos virtualmente idénticos de 23 cromosomas, uno aportado por el espermatozoide y otro por el

ovocito en el momento de la fecundación. De allí que se defina a las células somáticas como *diploides*, y a los espermatozoides y ovocitos como células *haploides*.

Los ADN de los 46 cromosomas contienen en conjunto unos 6×10^9 pares de nucleótidos. Por lo tanto, en promedio, una molécula de ADN de un cromosoma humano, si estuviera completamente extendida, mediría unos 4 cm de largo. Lógicamente, 46 moléculas de tamaño longitud, de hallarse extendidas, no podrían estar contenidas en el núcleo celular, no sólo por el espacio que demandarían sino por los enredos que se producirían, lo que afectaría su normal funcionamiento y hasta su propia integridad. La célula ha resuelto el problema de espacio haciendo que la molécula de ADN se enrolle sobre sí misma. Antes de analizar el modo como lo hace, debe advertirse que el grado de enrollamiento varía de acuerdo con el momento del ciclo en que se halla la célula, ya que es mínimo durante la interfase (cuando la síntesis de ARN es alta) y máximo cuando la célula se apresta a dividirse (en el capítulo 15 veremos el rol de tal enrollamiento en la división celular). Así, en las células vivas los cromosomas se muestran como estructuras altamente variables.

10-9. Existen cinco clases de histonas comprometidas en el enrollamiento de la cromatina

Las *histonas* desempeñan un papel fundamental en el enrollamiento de la cromatina. Se trata de proteínas con una alta proporción de lisina y arginina, es decir, de aminoácidos cargados positivamente. Esto contribuye a la unión de las histonas con las moléculas de ADN, en las cuales predominan las cargas negativas.

Existen cinco clases de histonas, llamadas H1, H2A, H2B, H3 y H4. La H1, de la cual existen seis subclases, contiene unos 220 aminoácidos, mientras que las restantes poseen entre 103 y 135 aminoácidos cada una. Estas últimas llevan el nombre de histonas nucleosómicas porque la molécula de ADN se enrolla en torno de ellas para formar los *nucleosomas*, que constituyen las unidades básicas

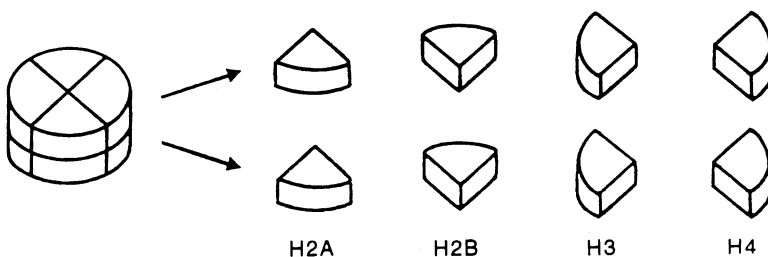


FIG. 10-6. Los cuatro pares de histonas que componen el nucleosoma.

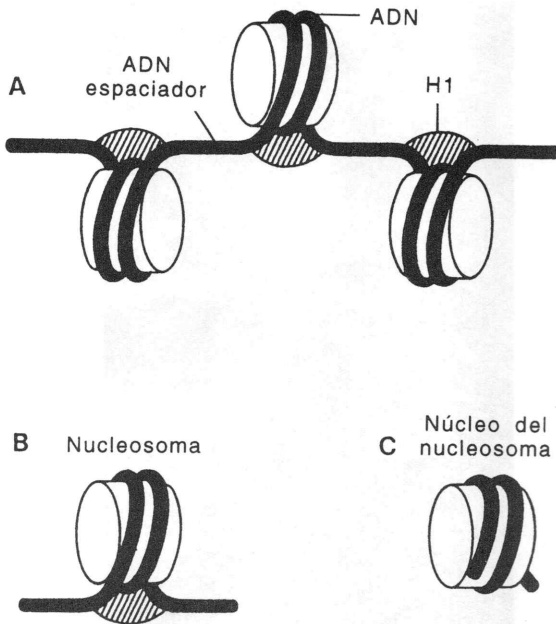


FIG. 10-7. A. Cromatina intacta. B. Nucleosoma escindido luego de una digestión moderada con una nucleasa. C. Nucleosoma con 146 pares de nucleótidos de ADN, liberado luego de la digestión intensa con una nucleasa.

del enrollamiento cromatínico (fig. 10-6). En cada nucleosoma, las histonas nucleosómicas se asocian para formar una estructura octamérica, compuesta por dos H2A, dos H2B, dos H3 y dos H4 (fig. 10-7).

El octámero posee el aspecto de un cilindro de baja altura, con un diámetro de unos 10 nm . Como acabamos de ver, se halla envuelto por un pequeño tramo de ADN, que recorre su circunferencia casi dos veces (fig. 10-6). Dado que cada vuelta equivale a 83 pares de nucleótidos, el segmento de ADN asociado al nucleosoma contiene en total 146 pares de nucleótidos. Los nucleosomas se hallan separados entre sí por tramos de ADN "espaciadores", cuya longitud es variable, y que contienen entre 20 y 60 pares de nucleótidos. La alternancia de nucleosomas y segmentos espaciadores le da a la cromatina la apariencia de un collar de cuentas (fig. 10-8). Dado que comúnmente un gen contiene unos 10.000 pares de nucleótidos, en él pueden contarse alrededor de 50 nucleosomas separados por otros tantos tramos de ADN espaciador. Debe señalarse que el tratamiento de la cromatina con enzimas que degradan el ADN (nucleasas o ADNasas) provoca cortes sólo en los segmentos espaciadores, de modo que los nucleosomas, si bien resul-

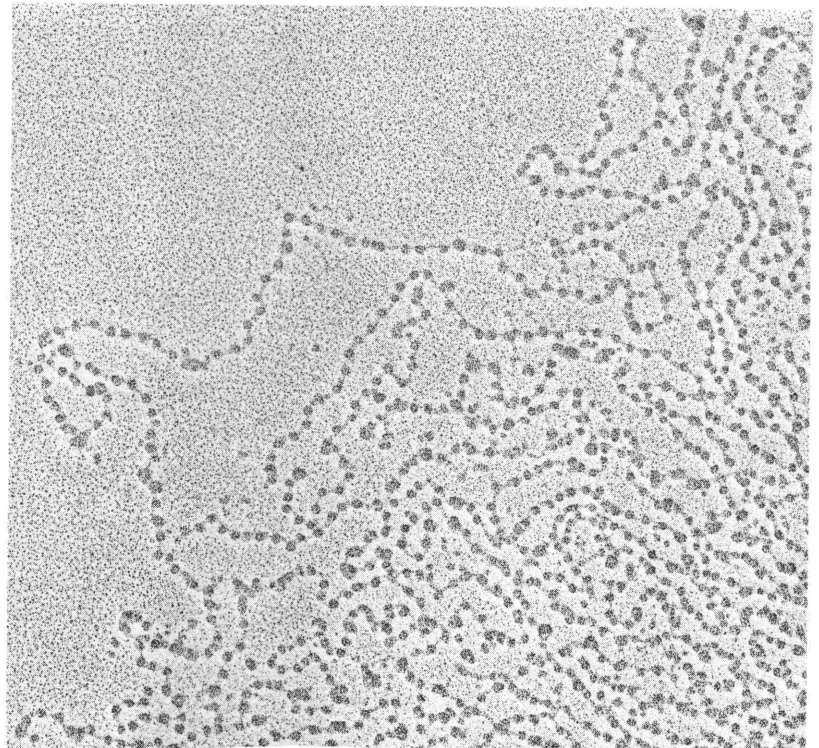


FIG. 10-8. Cromatina extendida para microscopía electrónica con apariencia de collar de cuentas, de 10 nm de espesor. Adquiere este aspecto cuando la muestra pierde la histona H1 durante la preparación.

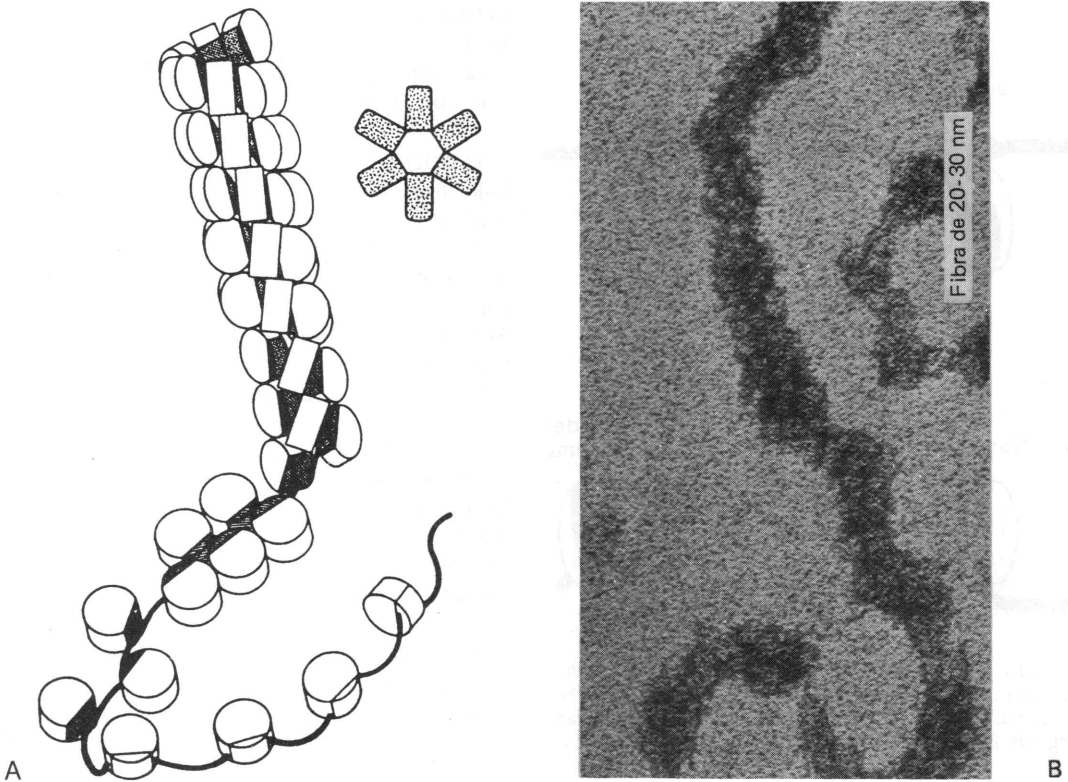


FIG. 10-9. A. Cromatina de 30 nm de diámetro. (De F. Thoma, T. Koller y A. Klug.) B. Micrografía electrónica de una fibra de cromatina de 30 nm de diámetro. (Cortesía de J. B. Rattner y B. A. Hamkalo.)

tan desunidos entre sí, quedan íntegros, tanto sus octámeros de histonas como los tramos de ADN asociados a ellos (fig. 10-7).

Para poder ser contenida en el pequeño espacio que el núcleo le ofrece, la cromatina de cada cromosoma debe experimentar nuevos y sucesivos grados de enrollamiento, cada vez más profundos.

En primer término, los propios nucleosomas se enrollan sobre sí y generan una estructura helicoidal llamada *solenoides*, de 30 nm de diámetro (fig. 10-9). Cada vuelta del solenoide contiene unos 6 nucleosomas, como muestra la figura 10-9. Se sospecha que tanto este como los ulteriores enrollamientos dependen de las histonas H1, las cuales, además, estabilizarían a las fibras de 30 nm. Debe señalarse que a intervalos más o menos regulares el enrollamiento que da lugar a las fibras de 30 nm se interrumpe, de modo que se observan, entre sectores de 30 nm, tramos cortos de cromatina más delgada. En ellos el ADN se encuentra asociado a proteínas no histónicas, en su mayoría reguladoras de la actividad génica.

La cromatina se compacta todavía más. Así, la fibra de 30 nm forma *lazos* o bucles de diferente longitud, los cuales emanan de un eje constituido por proteínas no histónicas (fig. 10-10). El conjunto

de ejes proteicos compone una suerte de andamiaje, de allí que en la base de cada lazo los tramos de ADN asociados a dichos ejes lleven el nombre de *SARs* (por *scaffold associated regions*). Los extremos de los lazos se hallan firmemente unidos a los ejes proteicos, pero se ignora cómo se sujetan a ellos las SARs. Se considera que cada lazo puede constituir una unidad de replicación del ADN (cap. 14-3) y, probablemente, una unidad de transcripción, es decir, un gen (cap. 12-12).

10-10. La cromatina puede ser eucromática o heterocromática

En algunos sectores la cromatina experimenta un grado de enrollamiento aún mayor, como se observa en las figuras 10-10 y 10-11. Durante la interfase, la cromatina así compactada recibe el nombre de *heterocromatina*, y se reserva el de *eucromatina* para la menos condensada.

Existe una relación directa entre el grado de enrollamiento y la actividad transcripcional del ADN. Así, la cromatina menos compactada es la que posee el ADN transcripcionalmente activo, es decir, el ADN en el que se están sintetizando moléculas de ARN. En el conjunto de células este ADN abarca

alrededor del 10% del genoma. En cambio, el ADN correspondiente a la cromatina más condensada es inactivo desde el punto de vista transcripcional. A esta categoría pertenece toda la heterocromatina y un vasto sector de la eucromatina, aquel cuyo nivel de enrollamiento se halla en un punto intermedio entre la eucromatina transcripcionalmente activa y la heterocromatina. Las regiones eucromáticas experimentan ciclos de contracción y extensión. En el capítulo 12-12 veremos cómo se regula el grado de compactación de la cromatina y qué papel desempeña en la regulación de la actividad génica.

10-11. La heterocromatina puede ser constitutiva o facultativa

Durante la interfase, recibe el nombre de heterocromatina *constitutiva* la cromatina altamente condensada que se halla de manera constante en todos los tipos celulares del organismo, es decir, como un componente estable del genoma, no convertible en eucromatina. A esta categoría pertenece la mayor parte de la cromatina que forma los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (véase más adelante) y la cromatina de los sectores cromosómicos que poseen ADN satélite (como la de los centrómeros, la de una parte del brazo largo del cromosoma Y, etc.), vistos en la sección 10-7.

En cambio, se le da el nombre de heterocromatina *facultativa* a la que se detecta en los cromosomas en localizaciones que varían de acuerdo con el tipo celular, de manera tal que sectores de cromatina que aparecen como heterocromatina en un tipo celular, en otros se presentan como eucroma-

rina. También el cuerpo de Barr (es decir, el cromosoma X compactado en las células de la mujer) corresponde a esta clase de heterocromatina.

10-12. En el cariotipo los cromosomas se ordenan sobre la base de sus tamaños y la posición de sus centrómeros

Como veremos en el capítulo 15, durante el ciclo celular, según la célula atraviese la etapa de interfase o se esté dividiendo (por mitosis o meiosis), los cromosomas pasan de un estado en el que se encuentran menos compactados a otros estados de mayor e incluso de total compactación. El más alto grado de enrollamiento se alcanza en la fase de la división celular llamada *metafase*, en la cual la cromatina de cada cromosoma, luego de duplicarse, muestra un estado de condensación similar al de la heterocromatina interfásica (figs. 10-13 y 14-3). Tal grado de compactación hace que los cromosomas lleguen a verse como estructuras individuales, las cuales, una vez fijadas y fotografiadas, pueden ser aisladas y ordenadas con relativa facilidad. El conjunto de tales cromosomas, dispuestos sobre una hoja de acuerdo con un orden preestablecido, recibe el nombre de *cariotipo* (fig. 10-14).

Las 46 unidades normalmente presentes en las células humanas consisten en 23 pares de cromosomas homólogos. Como vimos, 22 de estos pares están presentes tanto en la mujer como en el hombre y reciben el nombre de autosomas. El par restante —conocido como par sexual— en la mujer se halla integrado por dos cromosomas idénticos, llamados cromosomas X, y en el hombre por dos

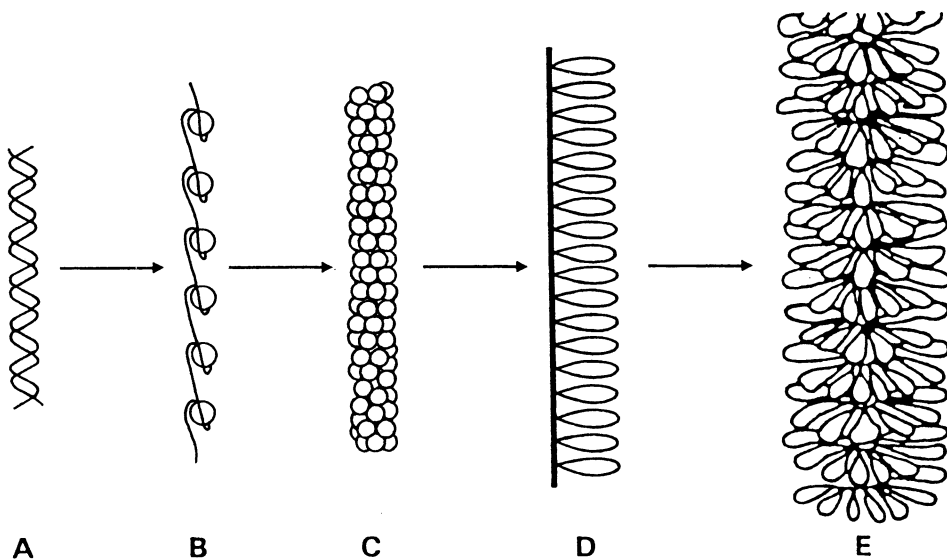


FIG. 10-10. Sucesivos grados de enrollamiento de la cromatina.



FIG. 10-11. Micrografía electrónica de un cromosoma humano al que se le extrajeron las histonas. Ciertas proteínas no histónicas forman un armazón, del que emergen lazos o bucles de ADN de diferente longitud, como se ilustra en el recuadro superior. (Cortesía de U. K. Laemmli.)

cromosomas bastante disímiles, ya que uno de ellos es un cromosoma X y el otro es el pequeño cromosoma Y.

Los cromosomas metafásicos presentan una morfología característica. Se hallan integrados por dos

componentes filamentosos —las *cromátidas*—, los cuales se encuentran unidos por el *centrómero* (o constricción primaria). Como veremos en el capítulo 15-9, el centrómero desempeña un papel esencial en la separación de las cromátidas herma-

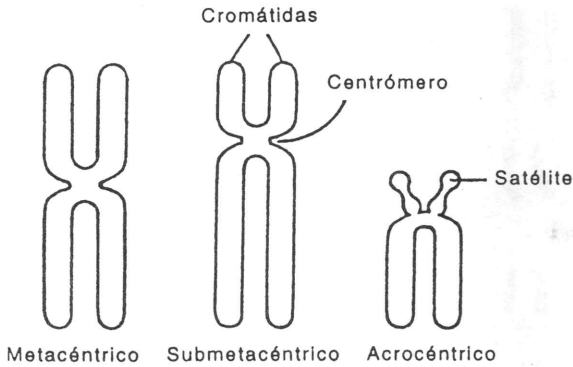


FIG. 10-12. Tipos de cromosomas según la posición del centrómero.

nas, hecho que tiene lugar durante una instancia ulterior de la división celular, en la etapa llamada anafase, que sigue a la metafase. Como consecuencia de tal separación, una vez segregadas en las respectivas células hijas, cada una de las cromátidas se convierte en un nuevo cromosoma.

La presencia del centrómero divide a cada cromátida del cromosoma metafásico en *dos brazos*, por lo general uno más largo que el otro. Al brazo corto se lo identifica con la letra p y al largo con la letra q. Los extremos de los brazos se denominan *telómeros*. De acuerdo con la posición del centrómero, los cromosomas se clasifican en tres grupos (fig. 10-12):

1. Los *metacéntricos* poseen el centrómero en una posición más o menos central, de modo que existe poca o ninguna diferencia en la longitud de los brazos de las cromátidas.

2. En los *submetacéntricos* el centrómero se encuentra alejado del punto central, de modo que las cromátidas poseen un brazo corto y uno largo (fig. 10-13).

3. En los *acrocéntricos* el centrómero se halla cerca de uno de los extremos del cromosoma y los brazos cortos de las cromátidas son por consiguiente muy pequeños.

En la figura 10-14 se muestra un cariotipo humano, en el que los cromosomas aparecen ordenados de acuerdo con su tamaño y morfología y los miembros de cada par con un número que los identifica.

Los cromosomas acrocéntricos corresponden a los números 13, 14, 15, 21 y 22. Poseen pequeñas masas de cromatina, llamadas *satélites* (no deben ser confundidas con el ADN satélite), ubicadas en el extremo libre de los brazos cortos. Los satélites se hallan ligados a los brazos cortos por delgados tallos de cromatina llamados *constricciones secundarias* (para diferenciarlos de la constricción primaria o centrómero) (fig. 10-12). Menos la cromatina

correspondiente a las constricciones secundarias —en la que se localizan los genes del ARN ribosómico (cap. 11-8)—, los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, incluidos los satélites, están compuestos por heterocromatina.

10-13. Las técnicas de bandeo cromosómico revelan detalles estructurales de los cromosomas

Cuando los cromosomas metafásicos son sometidos a determinadas técnicas de tinción, exhiben bandas claras y oscuras intercaladas, dispuestas a lo largo de sus ejes (fig. 10-15). La distribución de estas bandas es constante en cada tipo de cromosoma, lo cual, al analizar un cariotipo, facilita la identificación de los cromosomas. Más aún, en los casos en que sus ubicaciones no coinciden con los

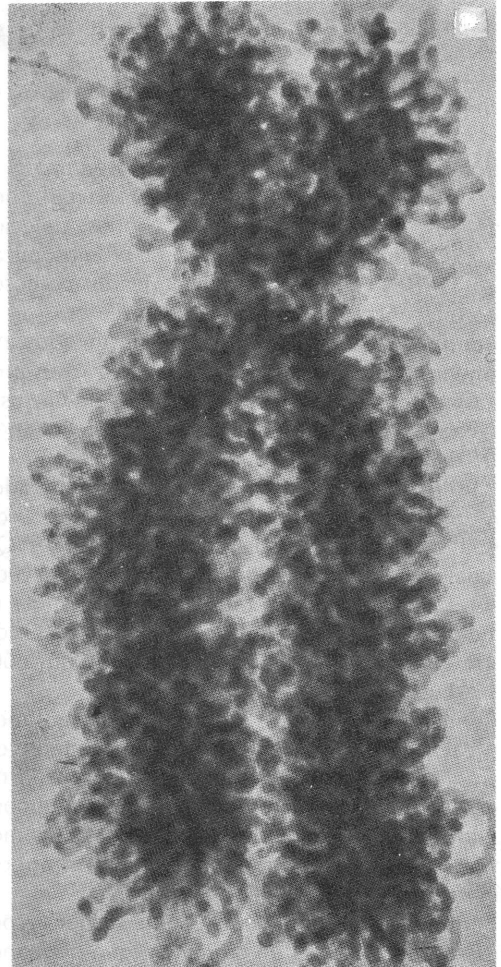


FIG. 10-13. Micrografía electrónica del cromosoma submetacéntrico humano número 12 en metafase. (Cortesía de E. J. Dupraw.)

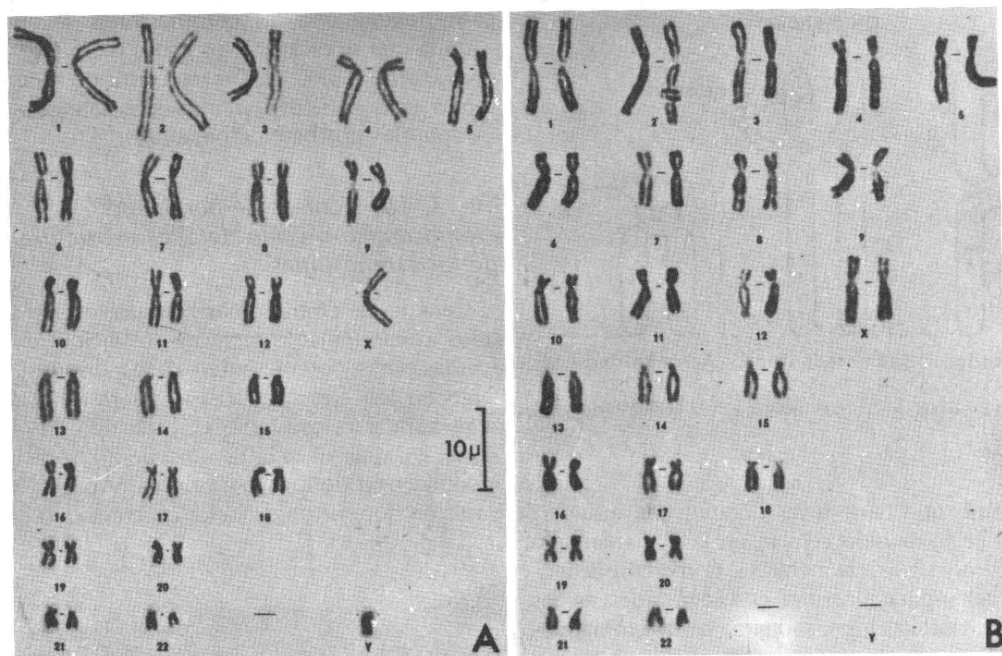


FIG. 10-14. Cariotipos humanos normales. A. Masculino. B. Femenino. (Cortesía de M. Drets.)

patrones normales, las bandas constituyen una guía muy valiosa para diagnosticar diversos trastornos genéticos, por ejemplo, translocaciones, deleciones, inversiones y duplicaciones cromosómicas (cap. 17-10). Las técnicas de bandeado cromosómico más utilizadas son las siguientes:

Bandeado G. Los cromosomas son tratados inicialmente con tripsina (para desnaturalizar sus proteínas) y luego teñidos con el colorante de Giemsa. Las bandas G, que aparecen oscuras, contienen ADN ricos en pares de nucleótidos A-T.

Bandeado Q. Si los cromosomas son tratados con quinacrina desarrollan un patrón específico de bandas oscuras intercaladas con otras brillantes (Q), las cuales resultan fáciles de identificar con la ayuda de un microscopio de fluorescencia. Las bandas Q coinciden casi exactamente con las bandas G, de modo que también son ricas en pares de nucleótidos A-T.

Bandeado R. En este caso los cromosomas reciben calor antes de ser teñidos con el colorante de Giemsa, lo que da como resultado un patrón de bandas oscuras (bandas R) y claras inverso al conseguido con los bandeados G y Q. El análisis molecular de las bandas R muestra una mayor proporción de pares de nucleótidos G-C.

Bandeado C. Este método tiñe de manera específica aquellos tramos de cromatina que permanecen condensados también en la interfase, por ejemplo, la heterocromatina constitutiva de los centrómeros.

10-14. Se cree que existe un ordenamiento espacial de los componentes nucleares

Se desconoce que exista en el núcleo un andamiaje de filamentos equivalente al del citoesqueleto. No obstante, algunos experimentos sugieren que durante la interfase los cromosomas o las distintas partes de éstos se encuentran localizados en posiciones constantes y específicas. Más aún, los patrones de distribución de los centrómeros y los telómeros se modificarían a lo largo del ciclo celular y parecen ser dependientes del tipo celular. Los genes involucrados en la codificación del ARN ribosómico constituyen un caso particular, ya que se encuentran agrupados en el sector del núcleo correspondiente al nucléolo (cap. 11-8). Por otra parte, vastas porciones de heterocromatina se localizan en la vecindad de la lámina nuclear, alejadas de los poros nucleares (fig. 10-2).

BIBLIOGRAFIA

- Back F. (1976) The variable condition of euchromatin and heterochromatin. *Int. Rev. Cytol.* 45:25.
- Bickmore W. A. and Sumner A.T. (1989) Mammalian chromosome banding—an expression of genome organization. *Trends Genet.* 5:144.
- Bonner W. (1978) Protein migration and accumulation in nuclei. In: *The Cell Nucleus*. Academic Press, New York.
- Bostock C. J. and Sumner A. T. (1978) *The Eukaryotic Chromosome*. North-Holland Publishing, Amsterdam.
- Britten R. J. and Kohne (1968) Repeated sequences in DNA. *Science* 161:529.
- Brown S. W. (1966) Heterochromatin. *Science* 141:417.

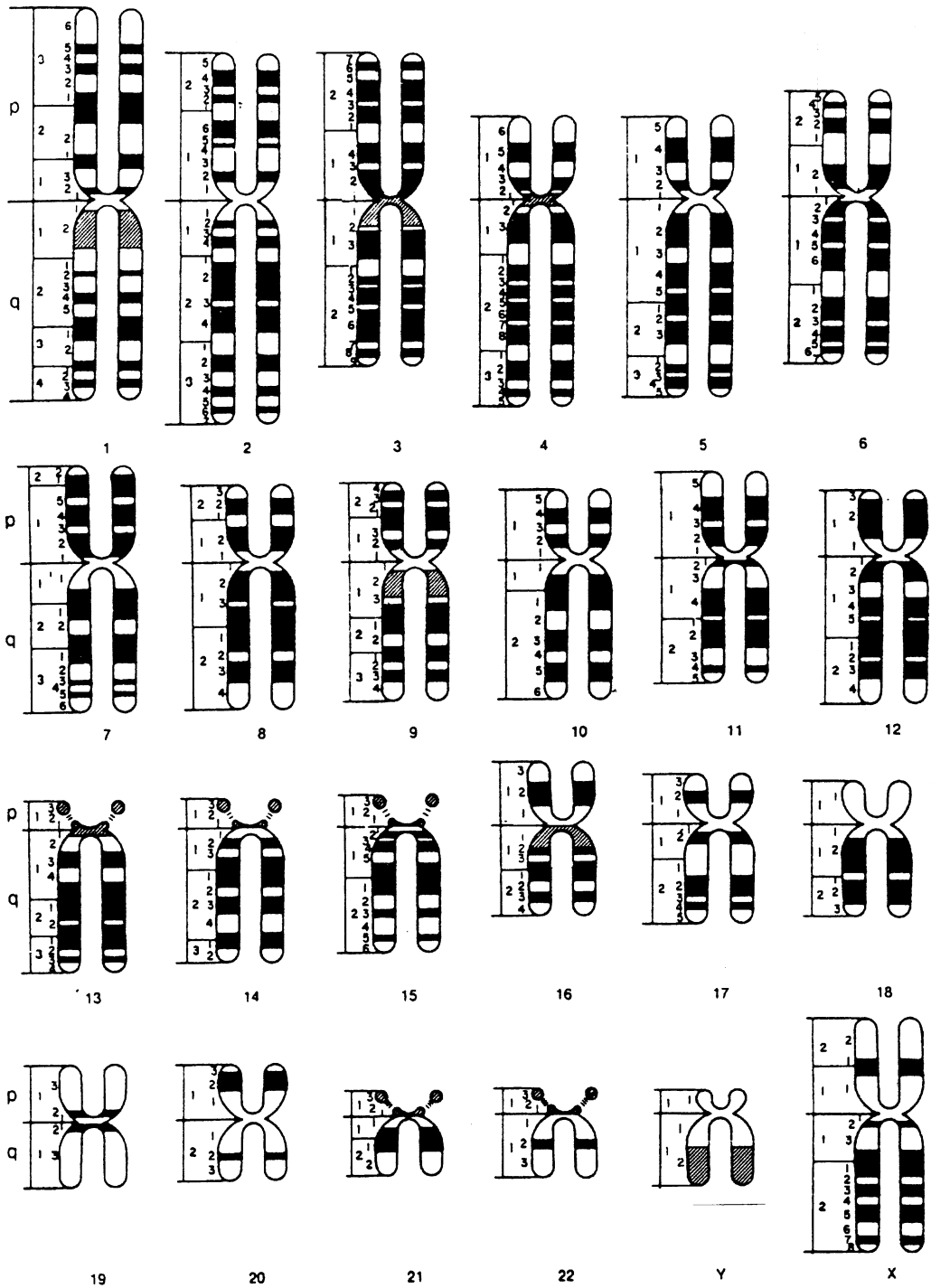


FIG. 10-15. Cariotipo humano con bandeo, que muestra los 22 autosomas y los cromosomas X e Y. p, brazo corto; q, brazo largo. Los números corresponden a las regiones y bandas. Los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 contienen satélites y constricciones secundarias, en las que se localizan los genes del ARNr 45S.

Burlingame R. W. et al. (1985) Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. *Science* 228:546.

Chambon P. (1977) The molecular biology of the eukaryotic genome is coming of age. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42:1209.

- Cheng Y., Dahlberg J. E. and Lund E. (1995) Diverse effects of the guanine nucleotide exchange factor RCC1 on RNA transport. *Science* 267:1807.
- DePamphilis M. L. (1993) Origins of DNA replication that function in eucaryotic cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:434.
- De Robertis E. M., Longthorne R. F. and Gurdon J. B. (1978) Intracellular migration of nuclear proteins in *Xenopus* oocytes. *Nature* 272:254.
- De Robertis E. M. (1983) Nucleocytoplasmic segregation of proteins and RNAs. *Cell* 32:1021.
- Dingwall C. and Laskey R. (1992) The nuclear membrane. *Science* 258:942.
- Felsenfeld G. (1985) DNA. *Sci. Am.* 253 (4):58.
- Felsenfeld G. and McGhee J.D. (1986) Structure of the 30 nm chromatin fiber. *Cell* 44:375.
- Fitzgerald-Hayes M., Clarke L. and Carbon J. (1982) Nucleotide sequence comparison and functional analysis of yeast centromere DNAs. *Cell* 29:235.
- Franke W. W. and Scheer U. (1974) The nuclear envelope. In: *The Cell Nucleus*. Academic Press, New York.
- Franke W. W., Scheer U., Krohne G. and Jarasch E. D. (1981) The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery. *J. Cell Biol.* 91:395.
- Gall G. (1981) Chromosome structure and C-value paradox. *J. Cell. Biol.* 91:35.
- Gerace L. and Blobel G. (1980) The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19:277.
- Gerace L. and Burke B. (1988) Functional organization of the nuclear envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:335.
- Goldstein L. (1974) Movement of molecules between nucleus and cytoplasm. In: *The Cell Nucleus*. Academic Press, New York.
- Heald R. and McKeon F. (1990) Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61:579.
- Igo-Kemenes T., Hörz W. and Zachau H. G. (1982) Chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 51:89.
- Isenberg I. (1979) Histones. *Annu. Rev. Biochem.* 48:159.
- Jeffreys A. J., Wilson V. and Thein S. C. (1985) Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature* 316:76.
- Kitsberg D., Selig S. and Cedar H. (1991) Chromosome structure and eukaryotic gene organization. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1:534.
- Kornberg R. D. (1981) The location of nucleosomes in chromatin: specific or statistical? *Nature* 292:579.
- Kornberg R. D. and Klug A. (1981) The nucleosome. *Sci. Am.* 244 (2):52.
- Laemmli U. K., Cheng S. M., Adolph K. W., Paulson J. R., Brown J. A. and Baumbach W. R. (1977) Metaphase chromosome structure: The role of nonhistone proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42:351.
- Lohe A. R. and Hilliker A. J. (1995) Return of the H-word (heterochromatin). *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:746.
- McGhee J. D. and Felsenfeld G. (1980) Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem.* 49:1115.
- Manuelidis L. (1990) A view of interphase chromosomes. *Science* 250:1533.
- Marsden M. P. F. and Laemmli U. K. (1979) Metaphase chromosome structure: Evidence for a radial loop model. *Cell* 17:849.
- Moore M. S. (1996) Protein translocation: nuclear export-out of the dark. *Curr. Biol.* 6:137.
- Naegele R., Freeman T., McMorrow L. and Lee H. (1995) Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order. *Science* 270:1831.
- Newport J. W. and Forbes D. J. (1987) The nucleus: structure, function and dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* 56:535.
- Price C. M. (1992) Centromeres and telomeres. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:379.
- Richmond T. J. et al. (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311:532.
- Ris H. and Witt P. L. (1981) Structure of the mammalian kinetochore. *Chromosoma* 82:153.
- Schmid C. W. and Jelinek W. R. (1982) The Alu family of dispersed repetitive sequences. *Science* 216:1065.
- Stewart A. (1990) The functional organization of chromosomes and the nucleus. *Trends Genet.* 6:377.
- Sunkel C. E. and Coelho P. (1995) The elusive centromere: sequence divergence and functional conservation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:756.
- Swedlow J. R., Agard D. A. and Sedat J. W. (1993) Chromosome structure inside the nucleus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:412.
- Swift H. (1973) The organization of genetic material in eukaryotes: Progress and prospects. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38:963.
- Szostak J. W. and Blackburn E. H. (1982) Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29:245.
- Weis K., Mattaj J. W. and Lamond I. (1995) Identification of hSRP1 as a functional receptor for nuclear localization sequences. *Science* 268:1049.
- Weisbrod S. (1982) Active chromatin. *Nature* 297:289.
- Zapp M. L. (1995) The ins and outs of RNA nucleocytoplasmic transport. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:229.
- Zlatanova J. and Yaneva J. (1991) Histone H1-DNA interactions and their relation to chromatin structure and function. *DNA Cell Biol.* 10:239.

11 / Estructura de los genes

José Hib

11-1. Los genes son segmentos útiles de ADN

Según el sentido con que se realice su estudio, un gen puede analizarse desde tres ángulos diferentes: el mendeliano, el molecular y el poblacional. La biología celular, que lo estudia desde el punto de vista molecular, lo define como “la secuencia de ADN cromosómico que contiene la información requerida para fabricar un ARN y, a través de éste —en la mayoría de los casos—, una proteína”. Esta unidad de información se halla en un sitio particular del cromosoma que lleva el nombre de “*locus*”. En el capítulo 10-9 vimos que cada uno de los lazos formados en el cromosoma al plegarse la cromatina podría corresponder a un gen. Se estima que existen unos 100.000 genes, y que en total abarcan aproximadamente sólo el 10% del ADN, ignorándose el significado del ADN restante.

Los genes no sólo dirigen la producción de ARN o proteínas. Como el resto del ADN, antes de que las células somáticas se dividan ellos se replican, es decir, sintetizan moléculas de ADN complementarias con el fin de autoperpetuarse, y los dos ADN resultantes se reparten en las células hijas. Por otra parte, dado el modo como la molécula de ADN se replica y distribuye en las células germinativas durante la meiosis, los genes constituyen las entidades biológicas mediante las cuales los caracteres físicos se transmiten de los padres a los hijos. Más aún, a lo largo del tiempo los genes acumulan mutaciones, muchas de las cuales suelen ser perjudiciales para el organismo, aunque otras pueden terminar siendo beneficiosas para su evolución.

Dado que la información genética depositada en las moléculas de ADN se encuentra en el núcleo (con excepción del ADN mitocondrial, visto en el capítulo 9-25), pero la síntesis proteica —basada en dicha información— tiene lugar en el citoplasma, es necesario que aquélla sea transferida desde

el núcleo al citosol (fig. 11-1). Tal transferencia es un proceso complejo que requiere la intervención de una molécula intermediaria. Trátase del ARN mensajero (ARNm), que copia la información contenida en el ADN, sale del núcleo y, una vez en el citosol, dirige la síntesis de la proteína. Así, en el núcleo el ADN guía la síntesis del ARNm, determinando la secuencia de sus nucleótidos, y en el citoplasma el ARNm dirige la síntesis de la proteína, estableciendo el orden de sus aminoácidos (fig. 11-2).

La síntesis del ARN, que como acabamos de ver usa como molde al ADN, se denomina *transcripción*, mientras que la síntesis de la proteína, cuyo

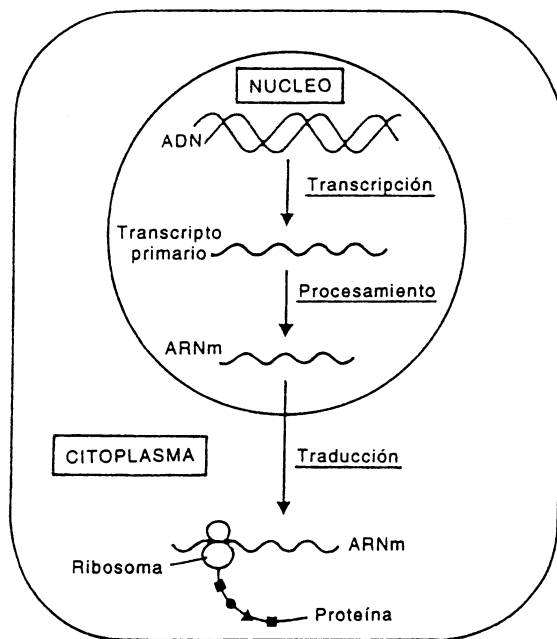


FIG. 11-1. Flujo de información genética en una célula eucariota.

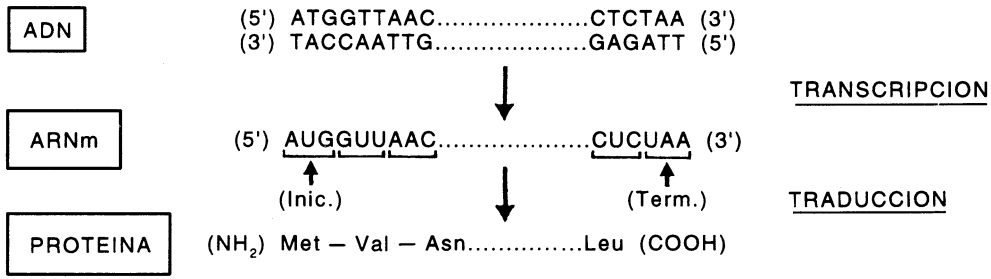


FIG. 11-2. Transferencia de la información genética contenida en la secuencia de nucleótidos del ADN, que pasa al ARNm (transcripción) y de éste a la proteína (traducción).

molde es el ARNm, lleva el nombre de *traducción*. Este flujo de información se conoce como el “*dogma central*” de la biología molecular (fig. 11-3). Las metáforas utilizadas para definir ambos pasos son bastante justas, ya que transcripción significa “copia literal de un original” (el ARN se parece al ADN) y traducción indica “escritura o expresión en un lenguaje de lo que anteriormente ha sido escrito o expresado en otro” (es lo que ocurre entre la proteína y el ARNm). Respecto del término *replicación*, significa “copia que reproduce con exactitud el original”, que es lo que hace el ADN al sintetizarse.

Al definirse al gen como una región del ADN que genera un carácter físico susceptible de ser heredado, se ha sugerido que cada gen da lugar a una sola clase de proteína. Si bien la mayoría de los genes que generan ARN mensajeros se conduce de esa manera, algunos producen ARNm que dan lugar a *poliproteínas*, es decir, productos transitorios de los que posteriormente surgen varias proteínas, cada una determinante de un rasgo físico diferente.

11-2. El transcripto primario está integrado por intrones y exones

Muy pocos genes poseen una secuencia de nucleótidos totalmente utilizables, ya que en la mayor parte de los casos presentan tramos de nucleótidos ociosos, llamados *intrones*. Estos sectores “superfluos” de ADN se hallan intercalados entre los segmentos provechosos, a los que se denomina *exones* (fig. 11-5). La molécula completa de ARN surgida de la transcripción lleva el nombre de *transcripto primario*. En ella no sólo han sido copiados los exones sino también los intrones (fig. 12-12). En el próximo capítulo veremos cómo, antes de abandonar el núcleo, los intrones son removidos del ARN

del transcripto primario por un proceso que incluye cortes entre los intrones y los exones y ulteriores empalmes entre los extremos libres de estos últimos, lo que elimina las secuencias inútiles y crea una molécula de ARN continua en la que las secuencias aprovechables se hallan alineadas en forma consecutiva.

11-3. La célula produce varias clases de ARN

Existen tres tipos principales de ARN: el ya mencionado *ARN mensajero*, que recoge la información del gen y dirige la síntesis de las proteínas, y otros dos estructurales, representados por los *ARN de transferencia* (ARNt) y los *ARN ribosómicos* (ARNr). Tanto los ARNt como los ARNr también participan en la síntesis de las proteínas, aunque cumpliendo roles muy diferentes de los del ARNm. En efecto, la síntesis proteica (traducción) tiene lugar en los ribosomas, que son organoides citoplasmáticos contruidos con el concurso de ARN ribosómicos y proteínas. En los ribosomas se producen —bajo la dirección del correspondiente ARNm— las reacciones químicas que ligan a los aminoácidos entre sí. La traducción incluye además la participación del ARNt, del cual existen diversos subtipos. Estos ARNt, actuando como adaptadores, llevan a los distintos aminoácidos hacia el ribosoma en el orden marcado por la secuencia de los nucleótidos del ARNm.

Además de las tres clases de ARN que acabamos de mencionar, existen otros dos tipos de ARN —ambos pequeños—, uno localizado en el núcleo y otro en el citosol. Los ARN pequeños confinados en el núcleo integran unas ribonucleoproteínas llamadas *RNPs* (por *small nuclear ribonucleoprotein*), las cuales tienen roles salientes durante el procesamiento de los transcriptos primarios (cap. 12-17).

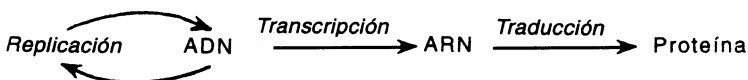


FIG. 11-3. Flujo de información genética.

Por su lado, los ARN pequeños que salen al citosol (ARNsc) integran las *partículas PRS* (cap. 8-5); se sospecha que son codificados por el ADN repetitivo de la familia Alu (cap. 10-7).

De lo mencionado hasta aquí se deduce que el genoma está compuesto por los siguientes tipos de genes: los más numerosos, que determinan la síntesis de los ARNm (y en consecuencia la de las respectivas proteínas); los que conducen la síntesis de los ARNt; los que guían la síntesis de los ARNr, y los que dan lugar a los ARN pequeños. Sus estructuras serán analizadas más adelante.

11-4. Cada aminoácido es codificado por un triplete de nucleótidos

Cuando un gen contiene la información necesaria para generar un ARN o una proteína suele decirse que el gen *codifica* a una de esas moléculas. Esta expresión se debe a que las instrucciones trasladadas del ADN al ARN, y en el caso del ARNm, de éste a la proteína, son transmitidas en forma de códigos.

Las características de las moléculas que encarnan los procesos genéticos han sido analizadas en el capítulo 2. Recordemos que tanto los ácidos nu-

cleicos (ADN, ARN) como las proteínas son moléculas que se hallan conformadas por secuencias de subunidades dispuestas en línea (monómeros), constituidas por nucleótidos en los primeros y por aminoácidos en las segundas. El sistema de códigos utilizado por las células se basa en el orden en que se encuentran los nucleótidos en el ADN, que determina el ordenamiento de los nucleótidos en el ARN, y por ende la secuencia de los aminoácidos en la proteína.

Si en el proceso de transmisión de la información cada nucleótido (A, G, C o T en el ADN; A, G, C o U en el ARN) representara una letra, el alfabeto contenido en las moléculas de ADN o ARN —al poseer 4 letras solamente— sería insuficiente para simbolizar a los 20 tipos de aminoácidos diferentes que pueden hallarse en una proteína.

La célula ha resuelto el problema utilizando grupos de tres nucleótidos —en distintas combinaciones— para codificar a cada tipo de aminoácido. Estos tripletes de nucleótidos se denominan *codones*. Dada la existencia de 4 tipos de nucleótidos en los ácidos nucleicos, el número de tripletes posible, es decir, de codones, es de 64 ($4^3 = 64$). El conjunto de 64 codones lleva el nombre de *código genético* (fig. 11-4).

Primera base	Segunda base								Tercera base
	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Term.	UGA	Term	A
	UUG	Leu	ACG	Ser	UAG	Term.	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gin	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gin	CGG ⁵	Arg	G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	<u>AUG</u>	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

FIG. 11-4. Código genético. El codón AUG marca el comienzo de la síntesis proteica (codón de iniciación) y codifica las restantes metioninas de la proteína.

11-5. Existen 61 codones para codificar a los 20 tipos de aminoácidos

Debido a que se utilizan casi todos los codones (61 de los 64) para codificar a los 20 tipos de aminoácidos, la mayor parte de éstos pueden ser codificados por más de un codón, condición que recibe el nombre de “*degeneración*”. Los distintos codones que simbolizan a un mismo aminoácido se llaman “*sinónimos*”. Solamente la metionina y el triptófano, que son los aminoácidos menos numerosos en las proteínas, son especificados por un solo codón. Los tres codones restantes (UAA, UGA y UAG) tienen por mandato, una vez que la cadena polipeptídica ha incorporado el último de sus aminoácidos, señalar la conclusión de la síntesis de la molécula proteica. Reciben el nombre de *codones de terminación* (fig. 11-4).

En esencia, las instrucciones emanadas del código genético consisten en una retahíla de tripletes de nucleótidos en el ADN, cuya secuencia determina la alineación de los codones en el ARN transcrito, que son los que finalmente especifican el ordenamiento de los distintos aminoácidos en la proteína. No obstante, debido a que en la mayor parte de los transcritos primarios existen tramos de nucleótidos que se suprimen (intrones), éstos, y por lo tanto los correspondientes en el ADN, no se hallan representados en la molécula proteica. Salvo por esto último, de lo dicho hasta aquí se deduce que en cada serie ADN→ARN→proteína, las unidades que componen tales moléculas son “colineales”, ya que los distintos nucleótidos del ADN se corresponden con los del ARN, y éstos con los aminoácidos de la proteína.

11-6. El gen posee varias partes funcionales

Hasta ahora nos hemos ocupado del segmento *codificador* del gen. Sin embargo, para que éste llegue a expresarse, es decir, dé lugar a un ARN, es necesario que participen secuencias de nucleótidos ajenas a dicho segmento, algunas de las cuales suelen hallarse bastante lejos del sector codificador. Tales secuencias también pertenecen al gen, aunque tienen por función controlar su actividad. Se dividen en tres grupos:

1. Aquellas secuencias que en conjunto componen el llamado *promotor*, que es el sector génico

que señala a partir de qué nucleótido el gen debe comenzar a transcribirse y que inicia la transcripción. Suelen localizarse cerca del extremo 5' del segmento codificador, punto de partida de la síntesis del ARN.

2. Otras secuencias, denominadas *reguladoras*, que determinan cuándo el gen debe comenzar a transcribirse y cuántas veces debe hacerlo en un tiempo dado. En la mayoría de los genes se localizan lejos del segmento codificador. Existen dos tipos de reguladores, unos llamados *amplificadores* y otros *inhibidores*. Los primeros, además de ser los más estudiados, son los que prevalecen. Cada gen suele incluir varios amplificadores y varios inhibidores. Además, dos o más genes distintos pueden contener algunos amplificadores o inhibidores comunes, aunque no existen genes con una misma combinación de ambas secuencias. Como es lógico, cuando se elimina experimentalmente en un gen algún amplificador, el ritmo transcripcional disminuye, y aumenta cuando se elimina un represor.

3. Finalmente, en la cercanía del extremo 3' del segmento codificador, el gen posee una sección de ADN llamada *secuencia de terminación* —no debe ser confundida con el codón de terminación del ARNm—, la cual, como contrapartida del promotor, señala la conclusión de la síntesis del ARN.

COMPOSICION DE LOS GENES

A continuación analizaremos —por separado— la composición de los genes que codifican a los ARNm, a los ARNt y a los ARNr.

11-7. Estructura de los genes que codifican a los ARN mensajeros

La figura 11-5 muestra los distintos componentes de los genes que codifican a los ARNm. El *promotor* en estos genes suele poseer dos elementos. La combinación más común incluye a las secuencias denominadas cajas TATA y CAAT, situadas cerca del segmento codificador, la TATA unos 25 nucleótidos “corriente arriba” del primer nucleótido de dicho segmento y la CAAT en el mismo lado pero un poco más lejos, a unos 75 nucleótidos, es decir, 50 nucleótidos “antes” de la secuencia TATA. La secuencia de nucleótidos más común exhibida por la

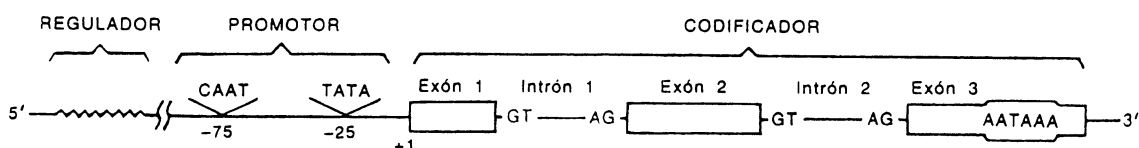


FIG. 11-5. Estructura general de los genes que codifican ARN mensajeros, con sus distintos componentes.

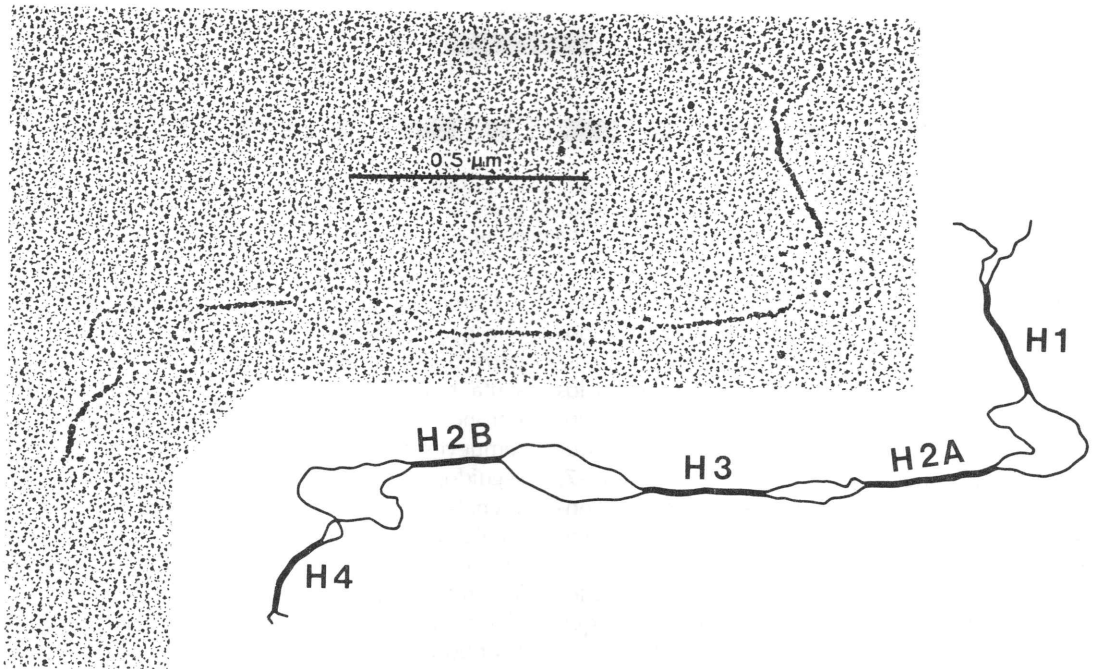


FIG. 11-6. Micrografía electrónica del ADN que contiene los cinco genes de las histonas, parcialmente desnaturizado. Estos genes están separados por segmentos espaciadores ricos en A-T. La molécula fue clonada en un plásmido de *Escherichia coli*. (Cortesía de M. L. Birnstiel y R. Portman.)

caja TATA es la TATAAAA, aunque el nucleótido T con frecuencia reemplaza al A en las posiciones quinta y séptima. Por su lado, la secuencia de la caja CAAT suele ser GGCCAATCT. Debe advertirse que muchos promotores contienen la secuencia TATA pero no la CAAT. A menudo se hallan ausentes las dos, en cuyo caso los promotores suelen presentar secuencias con una concentración inusualmente elevada de citosinas y guaninas, llamadas regiones "CG".

Los *reguladores* (amplificadores o inhibidores) también suelen hallarse "corriente arriba" respecto del extremo 5' del segmento codificador, aunque muy lejos, con frecuencia a miles de nucleótidos. Contrariamente a lo que ocurre con el promotor, la secuencia de nucleótidos en los reguladores —tanto en número como en calidad de nucleótidos— es específica, ya que varía en los distintos genes.

En el segmento *codificador* se alternan exones e intrones. La mayor parte de los genes codificadores de ARNm poseen entre uno y algo más de 60 intrones, y son muy pocos los que carecen de esta clase de secuencias removibles.

Las *secuencias de terminación* en este tipo de genes no han sido identificadas. No obstante, en un sector previo a ellas suele existir una secuencia compuesta por los nucleótidos TTATTT. Como veremos en el capítulo 12-16, esta secuencia —trans-

cripta como AAUAAA— interviene en la formación del extremo 3' del transcripto primario.

En su inmensa mayoría los genes que codifican a los ARNm constituyen *copias únicas*. La excepción más relevante corresponde a los genes que codifican a las cinco *histonas*. Estos cinco genes se hallan —en el cromosoma correspondiente— alineados uno detrás de otro, separados entre sí por tramos de ADN espaciadores que no se transcriben (fig. 11-6). Existen *entre 20 y 50 copias* de estos juegos de cinco genes dispuestas en tándem a lo largo del ADN, separadas entre sí por nuevos segmentos de ADN espaciadores.

11-8. Estructura de los genes que codifican al ARN ribosómico 45 S

Los *ribosomas* se construyen a partir de dos subunidades, cada una compuesta por ARNr asociados a numerosas proteínas. Los ARNr se identifican sobre la base de sus tamaños, expresados por coeficientes de sedimentación. Así, existen cuatro tipos de ARNr, llamados 28 S, 18 S, 5,8 S y 5 S (fig. 13-5). Los tres primeros derivan de un transcripto primario común denominado *ARNr 45 S* (fig. 12-22). Puede decirse, entonces, que existen dos tipos de genes codificadores de ARNr, el correspondiente al ARNr 45 S y el que codifica el *ARNr 5 S*. Aquí nos ocuparemos del primero.

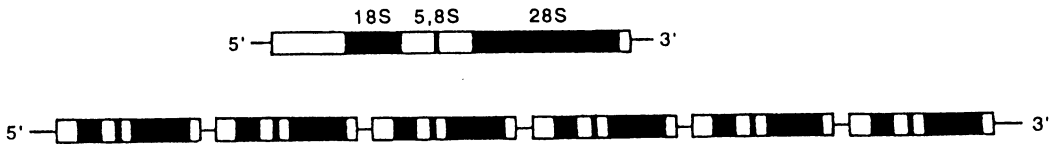


FIG. 11-7. Sucesión de genes del ARN ribosómico 45 S. Se hallan situados en la constricción secundaria de los cromosomas acrocéntricos. Obsérvense los segmentos espaciadores entre los genes (no se transcriben) y los segmentos espaciadores entre los tres componentes (18 S, 28 S y 5,8 S) de cada gen (se transcriben).

Del gen del ARNr 45 S existen unas 200 copias —alineadas en tándem—, separadas entre sí por segmentos de ADN espaciadores que no se transcriben (fig. 11-7). Estas copias se localizan en los ADN de las *constricciones secundarias* de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22, situadas en el *núcléolo*. Como puede observarse en la figura 11-7, dentro de cada copia las secuencias correspondientes a los ARNr 18 S, 5,8 S y 28 S —en este mismo orden— se hallan separadas por tramos de ADN espaciadores. Estos, a diferencia de los intercalados entre las 200 copias, se transcriben, de modo que aparecen en el transcripto primario o ARNr 45 S. En la figura 12-22 pueden observarse las ubicaciones de los segmentos espaciadores que se transcriben y el modo como son eliminados del ARNr 45 S. Así, la célula posee un eficiente mecanismo para remover, y luego destruir, los segmentos superfluos del ARNr transcripto. Ello ocurre en el propio *núcléolo*, el cual, junto a los genes ribosómicos, contiene temporariamente a los ARNr 45 S, para procesarlos en su interior (cap. 12-22).

El *promotor* del gen del ARNr 45 S, como en los genes de los ARNm, también se encuentra “corriente arriba” del extremo 5’ del segmento codificador (fig. 11-8). Se trata de una secuencia de alrededor de 70 nucleótidos, 20 de los cuales son también los primeros 20 nucleótidos del sector codificador. Así, leída en dirección 5’→3’, la última parte del promotor es al mismo tiempo la parte inicial del segmento codificador, hallándose los 50 nucleótidos restantes del promotor “antes” de dicho segmento.

El *regulador*, que actúa como amplificador, es una secuencia de alrededor de 100 nucleótidos. Está ubicado más lejos “corriente arriba”, a unos 50 nucleótidos del promotor, es decir, a unos 100 nucleótidos del extremo 5’ del segmento codificador.

Como acabamos de ver, el segmento *codificador* que genera el ARNr 45 S, además de los sectores correspondientes a los ARNr 18 S, 5,8 S y 28 S, presenta tramos espaciadores. Aquí no se habla de intrones y exones debido a que los cortes, si bien remueven las partes inútiles del ARN 45 S, no son seguidos por empalmes entre las secuencias aprovechables, ya que éstas deben persistir como moléculas de ARNr independientes. Tras ser separados, estos ARNr se ensamblan en el *núcléolo* con las proteínas correspondientes, luego salen del *núcleo* y finalmente participan en la construcción de los ribosomas en el *citósol*.

La *secuencia de terminación* aparece en el extremo 3’ del gen, aproximadamente unos 2.000 nucleótidos después del segmento que codifica al ARNr 28 S. Se caracteriza por presentar varias T seguidas.

11-9. Estructura del gen que codifica al ARN ribosómico 5 S

De este gen existen unas 2.000 copias, una tras otra a lo largo del cromosoma, alternándose cada copia con un tramo de ADN espaciador. A diferencia de los otros genes ribosómicos, ninguna de las copias del gen del ARNr 5 S se localiza en el *núcléolo*.

Cada copia del gen presenta una secuencia especial de nucleótidos en medio del segmento *codificador*, que constituye el promotor (fig. 11-9). Pero además posee una secuencia fuera del sector codificador, “antes” de él, cuya función, aunque imprescindible para la correcta transcripción del gen, no se sabe si es reguladora o forma parte del promotor. La *secuencia de terminación* en el extremo 3’, como la del gen del ARNr 45 S, presenta varias T contiguas.

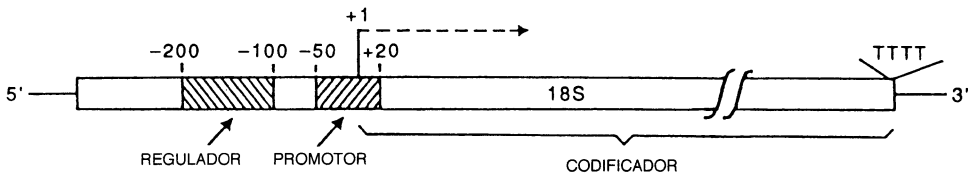


FIG. 11-8. Estructura general del gen que codifica al ARN ribosómico 45 S.

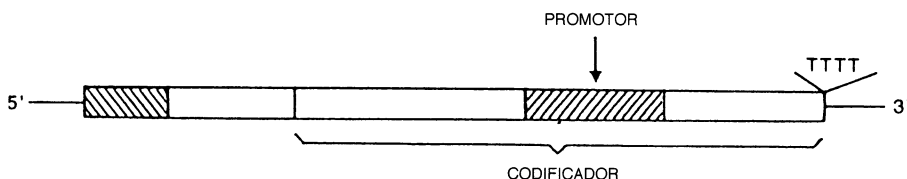


FIG. 11-9. Estructura general del gen que codifica al ARN ribosómico 5 S.

11-10. Estructura de los genes que codifican a los ARN de transferencia

Existen *entre 10 y 100 copias* para cada uno de los diferentes genes que codifican a los distintos ARNt, muchos de los cuales se hallan repetidos y alineados en tándem, en forma semejante a los genes de las histonas o del ARNr 45 S.

El *promotor* de estos genes está constituido por dos secuencias de nucleótidos separadas, ambas ubicadas en medio del segmento *codificador*, del que forman parte (fig. 11-10). Así, tales secuencias, además de cumplir funciones de promotor, se transcriben. No se han descrito secuencias reguladoras en los genes de los ARNt. En cambio, algunos de estos genes presentan un intrón —de 4 a 15 nucleótidos— en medio del segmento codificador, y por consiguiente 2 exones. La *secuencia de terminación* es semejante a la de los genes de los ARNr 45 S y 5 S.

11-11. Resumen

Concluimos esta sección sintetizando los componentes que integran un gen, cuya versión completa comprende:

1. La secuencia de nucleótidos que caracteriza a cada gen como una entidad individual, encargada de codificar a un ARN único y singular. Este puede corresponder a un ARNm, que en el citoplasma dirigirá la síntesis de una proteína específica, o ser un ARNr o un ARNt. Este segmento del gen —llamado *codificador*— abarca tanto sus partes utilizables, es decir, los exones, como los intrones, ya que éstos se encuentran también en el transcripto primario, nombre que se le da al ARN que emana del sector codificador del gen.

2. Las secuencias de nucleótidos encargadas de iniciar la transcripción del ADN, conocidas con el

nombre de *promotor*. En los genes que codifican ARN mensajeros y la mayor parte de los ARN ribosómicos tales secuencias se localizan cerca del extremo 5' del segmento codificador, mientras que las correspondientes a los genes de los ARNt y del ARNr 5 S se hallan en medio de dicho segmento. Las secuencias del promotor —dentro de cada clase de gen— son muy parecidas en los distintos tipos celulares, incluso entre los genes que codifican a los miles de ARN mensajeros.

3. Las secuencias de nucleótidos que determinan cuándo y cuántas veces debe transcribirse el gen, llamadas *reguladoras* (amplificadoras e inhibidoras). En los genes que codifican ARN mensajeros se localizan por lo general bastante lejos del segmento codificador, y sus nucleótidos varían, tanto en número como en calidad, en los distintos tipos de genes. No se han encontrado reguladores en los genes de los ARNt ni en el del ARNr 5 S.

4. Una secuencia de nucleótidos cercana al extremo 3' del segmento codificador —conocida como *secuencia de terminación*—, cuya presencia marca el fin de la transcripción de la cadena del ARN.

BIBLIOGRAFIA

- Adhya S. (1989) Multipartite genetic control elements: communication by DNA looping. *Annu. Rev. Genet.* 23: 227.
- Allison D., Goh S. H. and Hall B. D. (1983) The promoter sequence of a yeast tRNA-tyr gene. *Cell* 34:655.
- Benzer S. (1962) The fine structure of the gene. *Sci. Am.* 206 (1):70.
- Brown D. D. (1984) The role of stable transcription complexes that repress and activate eukaryotic genes. *Cell* 37:359.
- Brown D. D. and Gurdon J. B. (1978) Cloned single repeating units of 5S DNA direct accurate transcription of 5S RNA when injected into *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2849.

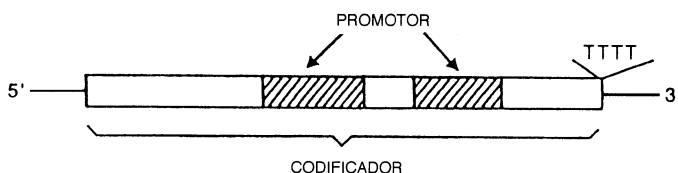


FIG. 11-10. Estructura general de los genes que codifican a los ARN de transferencia.

- Bucher P. and Trifonov E. N. (1986) Compilation and analysis of eukaryotic Pol II promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 14:10009.
- Chambon P. (1981) Split genes. *Sci. Am.* 244:60.
- Crick F. H. C. (1968) The origin of the genetic code. *J. Molec. Biol.* 38:367.
- Crick F. (1979) Split genes and RNA splicing. *Science* 204:264.
- Dreyfuss G., Philipson L. and Mattaj J. W. (1988) Ribonucleoprotein particles in cellular processes. *J. Cell Biol.* 106:1419.
- Dynam W. S. (1986) Promoters for housekeeping genes. *Trends Genet.* 2:196.
- Federoff N. (1979) On spacers. *Cell* 16:697.
- Galli G., Hoefstetter H. and Birnstiel M. L. (1981) Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature* 294:626.
- Gilbert W. (1976) Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. In: *RNA Polymerase*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Guthrie C. and Patterson B. (1988) Spliceosomal snRNAs. *Annu. Rev. Genet.* 22:387.
- Hentschel C. C. and Birnstiel M. L. (1981) The organization and expression of histone gene families. *Cell* 25:301.
- Horikoshi M., Hai T., Lin Y. S., Green M. R. and Roeder R. G. (1988) Transcription factor ATF interacts with the TATA factor to facilitate establishment of a preinitiation complex. *Cell* 54:1033.
- Karpen G. H., Schaefer J. E. and Laird C. D. (1988) A *Drosophila* rRNA gene located in euchromatin is active in transcription and nucleolus formation. *Genes & Devel.* 2:1745.
- Kerppola T. K. and Kane C. M. (1991) RNA polymerase: regulation of transcript elongation and termination. *FASEB J.* 5:2833.
- Lewin B. (1990) *Genes*, 4th Ed. Wiley, New York.
- Long E. O. and Dawid I. B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 49:727.
- Miller O. L. (1981) The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity. *J. Cell Biol.* 91:15s.
- Mitchell P. J. and Tijan R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245:371.
- Nevins J. R. (1983) The pathway of eukaryotic mRNA formation. *Annu. Rev. Biochem.* 52:441.
- Reddy R. and Busch H. (1981) U snRNA's of nuclear snRNP's. In: *The Cell Nucleus*. Academic Press, New York.
- Reeder R. H. (1984) Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell* 38:349.
- Sakonju S., Bogenhagen D. F. and Brown D. D. (1980) A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription. I: The 5' border of the region. *Cell* 19:13.
- Serfling E. M., Jasin M. and Schaffner W. (1985) Enhancers and eukaryotic gene transcription. *Trends Genet.* 1:224.
- Swift H. (1973) The organization of genetic material in eukaryotes: Progress and prospects. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38:963.
- Thompson C. C. and McKnight S. I. (1992) Anatomy of an enhancer. *Trends Genet.* 8:232.
- Wellaurer P. K. and Dawid I. B. (1979) Isolation and sequence organization of human ribosomal DNA. *J. Mol. Biol.* 128:289.
- Worton R. G. et al. (1988) Human ribosomal RNA genes: orientation of the tandem array and conservation of the 5' end. *Science* 239:64.
- Yanofsky C. (1967) Gene structure and protein structure. *Sci. Am.* 216:80.

12/Transcripción del ADN

José Hib

12-1. Definición

Recibe el nombre de *transcripción* la síntesis de moléculas de ARN sobre la base de moldes de moléculas de ADN. La síntesis se produce por la unión entre sí de los nucleótidos A, U, C y G, que se alinean de acuerdo con el ordenamiento marcado por los nucleótidos complementarios presentes en el ADN. Esa complementariedad determina que las bases A, U, C y G del ARN se apareen, respectivamente, con las bases T, A, G y C del ADN. Como veremos, el apareamiento es logrado por el establecimiento de uniones transitorias (no covalentes) de las bases del ADN con las bases del ARN en formación, lo cual hace posible que se produzcan las reacciones sintéticas propiamente dichas, es decir, la unión de los nucleótidos del ARN entre sí.

La unión entre dos nucleótidos consecutivos lleva el nombre de *unión fosfodiéster* (fig. 12-1).

Dado que en ella un grupo fosfato liga el C5' de la ribosa de un nucleótido con el C3' de la ribosa del nucleótido adyacente, la molécula de ARN resulta polarizada y queda siempre un fosfato en su extremo 5' y un hidroxilo en su extremo 3'. Como es obvio, las uniones fosfodiéster no se producen espontáneamente, sino que son dirigidas y catalizadas por enzimas específicas, las *ARN polimerasas*.

12-2. Las moléculas de ARN se sintetizan por el agregado de un nucleótido por vez

Desde el punto de vista teórico, un ARN podría construirse, a partir de nucleótidos libres, en cinco pasos: 1) primero se separarían las dos cadenas del ADN en toda su extensión; 2) luego, los ribonucleótidos del futuro ARN buscarían a los desoxirribonucleótidos complementarios del ADN y se aparearían con ellos, todos simultáneamente; 3) así

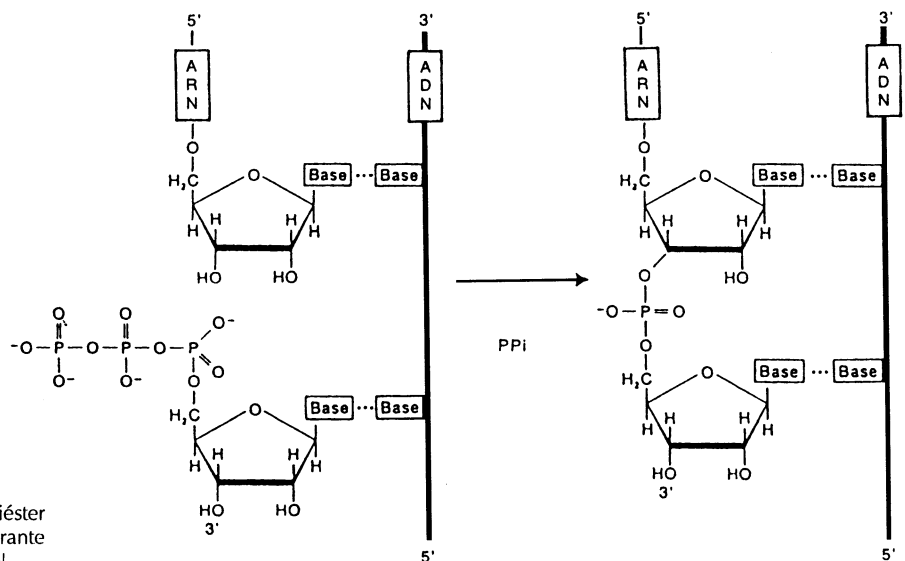


FIG. 12-1. Unión fosfodiéster entre dos nucleótidos durante la transcripción del ADN.

alineados, los ribonucleótidos se unirían entre sí —también simultáneamente—, cada uno con sus dos contiguos; 4) a continuación, los ribonucleótidos del ARN cortarían su unión con los desoxirribonucleótidos del ADN y se liberaría la molécula del ARN sintetizado; 5) finalmente, las dos cadenas del ADN se volverían a unir. Al resultar ambas cadenas del ADN expuestas por igual, podrían ser transcritas las dos.

Los hechos ocurren de otra manera. En primer lugar, porque la construcción del ARN es dirigida sólo por una de las dos cadenas del ADN, la dispuesta en dirección 3'→5'. Esto último permite anticipar que la síntesis del ARN se inicia en el extremo 5' de su molécula y progresa hacia el extremo 3' (fig. 11-2). En segundo lugar, porque el ARN no se construye globalmente sino paso a paso, ya que los ribonucleótidos se van eslabonando de a uno por vez. Por lo tanto, no es necesario que el ADN abra en un momento dado su doble hélice en toda su extensión. Solamente se separa y expone un tramo de alrededor de 10 pares de nucleótidos.

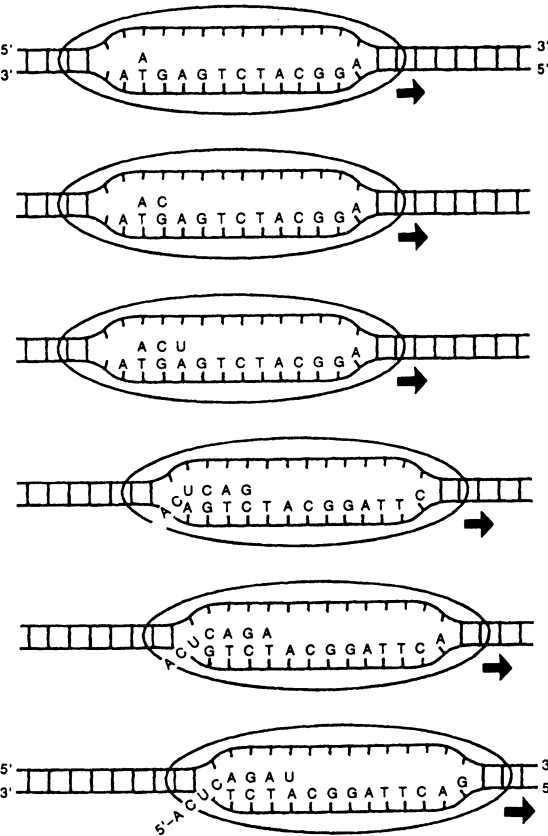


FIG. 12-2. Síntesis de ARN. Puede observarse la ARN polimerasa (figura ovoide) y la formación de una “burbuja” en el ADN, que se desplaza conforme se separan y reúnen las dos cadenas de este último.

Esta separación, limitada a tan pocos nucleótidos, forma en la molécula de ADN una suerte de “burbuja”, la cual se desplaza en dirección 5'→3' a medida que son “leídos” sus nucleótidos (fig. 12-2).

Dado que el ARN sintetizado se corresponde tanto en su polaridad como en la secuencia de sus nucleótidos (sustituyendo el U por la T) con la cadena no transcrita del ADN (es decir, la 5'→3'), convencionalmente se utiliza a esta última para identificar la secuencia del ADN transcrito (fig. 11-2).

12-3. Una ARN polimerasa une a los nucleótidos entre sí

Los monómeros con los que se construyen las moléculas de ARN se presentan en la matriz nuclear como ribonucleósidos trifosfato (ATP, UTP, CTP y GTP) (fig. 12-2). El inicio de la transcripción tiene lugar cuando uno de ellos, por su base, establece una unión transitoria con la base complementaria del primer nucleótido del ADN. En este proceso interviene el promotor del gen, luego de haberse activado por factores que veremos más adelante.

El promotor se une a la ARN polimerasa y hace que ésta interactúe con el ADN en el lugar en que deberá iniciarse la transcripción (el lugar es marcado por el propio promotor). Allí la ARN polimerasa determina la separación localizada de las dos cadenas del ADN, y deja expuesto —junto a otros pocos— el primer desoxirribonucleótido que será leído (fig. 12-2).

A continuación, en ese lugar se coloca el ribonucleósido trifosfato adecuado —será el primer nucleótido de la molécula de ARN—, y su base establece una unión no covalente con la complementaria del desoxirribonucleótido del ADN (fig. 12-2). Luego se arrima un segundo ribonucleósido trifosfato, complementario del segundo desoxirribonucleótido expuesto en el ADN, y sus bases se unen entre sí. Al quedar ambos ribonucleótidos juntos, entre ellos tiene lugar —mediante la ARN polimerasa— una unión fosfodiéster, lo cual genera un dinucleótido (figs. 12-1 y 12-2). Con él ha quedado iniciada la síntesis del ARN, que proseguirá en dirección 5'→3' al acercarse los sucesivos ribonucleósidos trifosfato determinados por el ADN, los cuales quedarán consecutivamente eslabonados a medida que se producen las respectivas uniones fosfodiéster.

La progresiva elongación de la molécula es dirigida por la misma ARN polimerasa, la cual —además de catalizar las uniones fosfodiéster— se desliza sobre el ADN en dirección 5'→3' y separa sus cadenas haciendo avanzar la burbuja. El avance se debe a la separación progresiva de los nucleótidos

en el lado frontal de la burbuja, al tiempo que en la retaguardia de esta última se restablece la doble hélice del ADN en la misma proporción (fig. 12-2). Esto es posible porque allí los nucleótidos del ARN se van separando del ADN. No obstante, la cadena del ARN —cada vez más larga— sigue unida a la cadena molde por sus últimos ribonucleótidos agregados.

La transcripción concluye cuando la ARN polimerasa alcanza la secuencia de terminación, situada en el extremo 3' del gen. En ese punto se libera la enzima y se desprende el ARN recién sintetizado, que adquiere el nombre de *transcripto primario*. En su extremo 5', el primer nucleótido de este ARN retiene los tres fosfatos, mientras que en el extremo 3' el último de sus nucleótidos exhibe un grupo OH (fig. 13-9).

En el capítulo 14-11 se analizará el papel de la enzima *topoisomerasa I* durante la transcripción.

12-4. Existen tres clases de ARN polimerasas

Existen tres tipos de ARN polimerasas —llamadas I, II y III— que sintetizan distintas clases de ARN. La *ARN polimerasa II* participa en la síntesis de los ARNm y en la de los ARNsn; la *ARN polimerasa I* interviene en la de los ARNr (45S), y la *ARN polimerasa III* lo hace tanto en la síntesis de los ARNt como en la del ARNr 5S.

Estas polimerasas poseen distintas sensibilidades a la α -amanitina, un veneno producido por el hongo *Amanita phalloides*: la ARN polimerasa II es muy sensible al veneno, la ARN polimerasa I es insensible, y la sensibilidad de la ARN polimerasa III se halla en un punto intermedio.

12-5. Antes de abandonar el núcleo los ARN son procesados

Se denomina *procesamiento* a los cambios que experimenta el transcripto primario antes de ser exportado al citoplasma. Como vimos en el capítulo anterior, el transcripto primario suele tener tramos de ARN superfluos: se trata de *intrones* en algunos casos y de *espaciadores* en otros; un episodio saliente del procesamiento corresponde a la remoción de esos segmentos de ARN no utilizables (fig. 12-12).

Privativo del procesamiento de los ARNm es el agregado en sus extremos 5' y 3' de sendas estructuras, llamadas *cap* (por "capuchón") y *poli A*; ambas son imprescindibles para el funcionamiento normal del ARNm (fig. 12-12).

ARN MENSAJERO

SÍNTESIS DEL ARN MENSAJERO

12-6. Los genes que codifican ARNm son activados por factores de transcripción

La síntesis de un ARNm dado se produce cuando el gen respectivo, mejor dicho, su promotor y las secuencias reguladoras, se activan por proteínas especiales, llamadas *factores de transcripción*. Los factores de transcripción se clasifican en *basales* y *específicos*. Los primeros interactúan con el promotor del gen y los segundos con el regulador (fig. 12-3, A). Además, los específicos se subdividen en *activadores* y *represores*, según interactúen con la secuencia amplificadora o con la inhibidora del regulador (cap. 11-6).

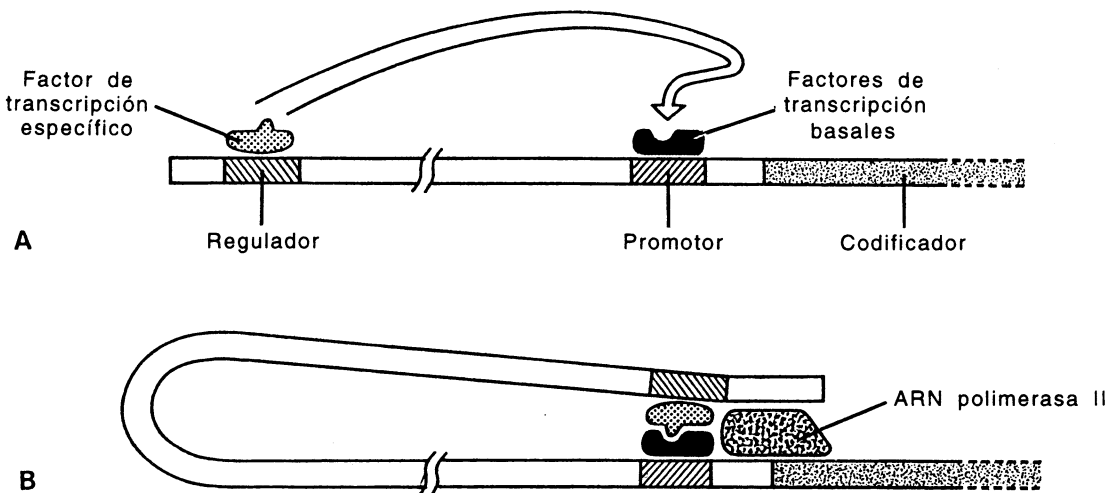


FIG. 12-3. A. Factores de transcripción específicos y basales unidos al regulador y al promotor del gen, respectivamente. B. El ADN se dobla sobre sí mismo para que el regulador y el promotor interactúen, lo que estimula la transcripción del sector codificador del gen por la ARN polimerasa II.

Los factores de transcripción basales son requeridos por la secuencia TATA del promotor para que dé comienzo la síntesis del ARNm (previamente debe activarse el regulador, como se verá en la próxima sección). Dada su naturaleza inespecífica (se dan en casi todos los ARNm), estos factores son los más conocidos. Existen varios —denominados TFIID, TFIIB, TFIIF, TFIIE, TFIIH, etc.—, los cuales actúan secuencialmente, haciéndolo en el orden con que fueron escritos. El TFIID se halla integrado por varias subunidades, una de ellas llamada *TBP* (por *TATA binding protein*) y las otras *TAFs* (por *TBP-associated factors*).

El proceso se inicia al unirse el TFIID al promotor a través de la TBP. Esta unión, debido a que aparentemente altera la estructura de la cromatina en el promotor, hace que éste abandone su forma rectilínea y se pliegue como si se cerrara una bisagra, formándose en él un ángulo de unos 100°. Tal cambio atraería hacia el promotor a los restantes factores de transcripción basales y también a la *ARN polimerasa II*, con la cual esos factores se unieron previamente.

Una vez que la ARN polimerasa II se ha unido al promotor es fosforilada por el TFIIH, que actúa como una quinasa. Un ATP dona el fósforo, luego de ser hidrolizado por el TFIIB. La ARN polimerasa II fosforilada se libera de los factores de transcripción y determina la apertura localizada de la doble hélice del ADN en el sector del gen marcado por el promotor —se forma así la “burbuja”—, y de esta forma inicia la síntesis del ARNm (fig. 12-2).

Para alargar el ARNm, la ARN polimerasa II necesita dos factores adicionales, los *factores de elongación* llamados SII y SIII. Este último, denominado también *elongina*, es un heterotrímero compuesto por las elonginas A, B y C, de 110 kDa, 18 kDa y 15 kDa, respectivamente. Se estima que durante la fase de alargamiento la ARN polimerasa II le agrega a la molécula de ARN unos 50 nucleótidos por segundo.

En los genes que codifican ARN mensajeros aún no han sido identificadas las secuencias de nucleótidos que provocan la terminación de la transcripción.

Hemos mencionado que el ARN recién sintetizado se denomina transcripto primario (cap. 11-2). El conjunto de transcriptos primarios precursores de los ARNm se conoce como *ARN heterogéneo nuclear* (ARNhn). Estos transcriptos no se encuentran libres en el núcleo, sino asociados con diversas proteínas básicas que se combinan con los ARN apenas éstos son sintetizados. El conjunto de transcriptos primarios asociados a esas proteínas lleva el nombre de *ribonucleoproteína heterogénea nuclear* (RNPhn).

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS GENES QUE CODIFICAN ARN MENSAJEROS

12-7. Los mecanismos más importantes para controlar la actividad de los genes actúan a nivel de la transcripción

Los mecanismos que determinan cuál proteína ha de ser sintetizada —y en qué cantidad— operan en la célula en varios niveles, aunque los más importantes son los que controlan la actividad transcripcional de los genes. No obstante, pueden producirse regulaciones después de la síntesis de los transcriptos primarios, durante su procesamiento e incluso más tarde, mediante el control de la exportación de los ARN mensajeros al citoplasma o de su supervivencia en el citosol (fig. 11-1). Finalmente, en algunos casos puede operarse un control durante la traducción de los ARNm en proteínas, o directamente sobre estas últimas, al ser regulada su degradación. El estudio de las regulaciones de la actividad génica, del procesamiento del ARNm y de la salida de éste al citoplasma será abordado en este capítulo, reservándose el análisis de las restantes regulaciones para el capítulo próximo.

Es oportuno señalar que el ARN de aproximadamente la mitad de los transcriptos primarios no completa su síntesis, ignorándose si esto se debe a la existencia de fallas en los procesos de transcripción o si se trata de un mecanismo generalizado de regulación de la actividad génica que opera precipitando la terminación de la transcripción antes de arribar la polimerasa II al lugar adecuado. Dado que solamente se han descrito unos pocos casos de regulación génica mediante la terminación prematura de la transcripción, se acepta que el mecanismo prevaleciente tiene lugar durante la iniciación de ésta, cerca del promotor.

Desde que se sabe que en los organismos pluricelulares todas las células poseen el mismo genoma se ha planteado el siguiente interrogante: ¿por qué un gen (o un conjunto de genes) es seleccionado para su transcripción en un tipo celular y no otro gen (u otro conjunto de genes)? La respuesta tiene varias facetas, cuyos contenidos han sido desarrollados en distintos lugares del libro. Así, en el capítulo 7 se analiza cómo las células responden al ser influidas por otras, en las siguientes secciones de este capítulo y en algunas del próximo se describen los mecanismos moleculares que llevan a las diferenciaciones celulares, y en el capítulo 18 se incluyen los conocimientos que completan el panorama. No obstante, los procesos involucrados en el desencadenamiento de la expresión génica confluyen en un punto relevante: una molécula —más precisamente, un *factor de transcripción específico*— que tras ser activada ingresa en el núcleo para activar a uno de los genes.

Recordemos que la polimerasa II por sí misma no puede iniciar la transcripción del sector codificador del gen; necesita ser activada por los factores de transcripción basales que actúan sobre el promotor, los cuales deben ser activados previamente por los factores de transcripción específicos unidos a las secuencias reguladoras. Dado que los primeros son los mismos en casi todos los genes, se dice que son *constitutivos*, mientras que los segundos, al ser específicos para cada gen en particular, se clasifican como *facultativos*.

Aunque los factores de transcripción específicos se cuentan por miles, son muchos menos que los genes que deben controlar. No obstante, la especificidad se logra mediante la creación de múltiples combinaciones entre ellos, lo cual aumenta el número de posibilidades en forma extraordinaria. Cada clase de célula contendría sólo una selección de esos factores, nada más que los imprescindibles para crear las combinaciones capaces de regular sus propios genes. En relación con este punto, en el capítulo anterior vimos que cada gen suele incluir varios amplificadores y varios inhibidores, y que dos genes distintos pueden contener algunos amplificadores o inhibidores comunes, pero que no existen dos genes con una misma combinación de tales secuencias.

Una vez que los factores específicos se han unido a las secuencias reguladoras, ¿cómo se conectan con las secuencias promotoras? (como se recordará, ambas secuencias suelen estar muy distanciadas). Simplemente el gen se curva y da lugar a un bucle o asa, como muestra la figura 12-3, B. Obsérvese el modo como los factores específicos unidos a las secuencias reguladoras colisionan con los factores basales situados en el promotor. Para ello los factores específicos cuentan con dos dominios, uno que se adapta al ADN regulador y otro que lo hace con los factores basales, más precisamente con las subunidades TAFs del factor TFIID. Estando el complejo completamente integrado, los factores basales hacen que la ARN polimerasa II inicie la transcripción del gen, mientras que los específicos disponen cuántas polimerasas —una tras otra— harán el trabajo; de este modo se regula la cantidad de ARNm que se fabricará.

A modo de resumen —y en términos automovilísticos—, el promotor representaría el encendido del motor del auto, el amplificador correspondería al acelerador y el inhibidor sería el freno. Por su lado, los factores de transcripción basales podrían ser comparados con la llave que pone en marcha el motor, los factores activadores con la mano del conductor que activa el encendido y con el pie que aprieta el pedal del acelerador, y los factores represores con el pie encargado de controlar el pedal del freno.

Los mecanismos reguladores de la actividad de los genes en las células procariotas serán analizados en las secciones 12-25 a 12-31.

12-8. La transcripción de los genes de los ARNm puede visualizarse con la ayuda del microscopio electrónico

La microscopia electrónica convencional no muestra cómo se transcriben los genes. Empero, cuando se dispersa el contenido del núcleo sobre una grilla, se ponen en evidencia detalles reveladores. Así, si un gen se transcribe a un ritmo acelerado —es decir, se halla asociado simultáneamente con varias ARN polimerasas II—, puede ser visto junto a muchas cadenas de ARNm que surgen perpendicularmente de su molécula, presentando en conjunto un aspecto semejante a un *árbol de navidad* cuyo tronco corresponde al gen y las ramas a los ARN mensajeros (fig. 12-4). El progresivo alargamiento de las ramas —cada vez más largas a medida que se alejan de la punta del árbol— indica la dirección de la transcripción. En el punto en que cada rama se une al tronco se localiza una ARN polimerasa II (suele verse en las microfotografías) y por lo tanto una “burbuja”. Si pudiéramos realizar una filmación veríamos a las burbujas desplazándose desde la punta del árbol hacia el suelo, cada una con su rama, que se desprende del tronco cuando alcanza su máxima longitud.

No son muchos los genes que producen ARN mensajeros a tan alta velocidad, pues la mayoría se transcribe a un ritmo relativamente moderado. Los más lentos inician una nueva transcripción sólo después de haberse terminado la anterior. En estos casos el gen se vería como un tronco con una sola rama —el ARNm—, cuyo largo y posición en el tronco dependerían del instante en que se haya tomado la microfotografía.

12-9. Se conocen las bases moleculares de la interacción de los factores de transcripción con el ADN de las regiones promotoras y reguladoras de los genes

La mayoría de los factores de transcripción y el ADN de los sectores promotores y reguladores del gen contienen en sus moléculas información suficiente para unirse entre sí en forma específica. Los factores de transcripción establecen contacto con el ADN mediante enlaces entre grupos químicos complementarios, de un lado aportados por los aminoácidos y del otro por las bases de los nucleótidos. Así, la especificidad de la reacción depende de la complementariedad estructural que se da entre las dos partes interactuantes, que a su vez depende de la secuencia de los aminoácidos en los dominios

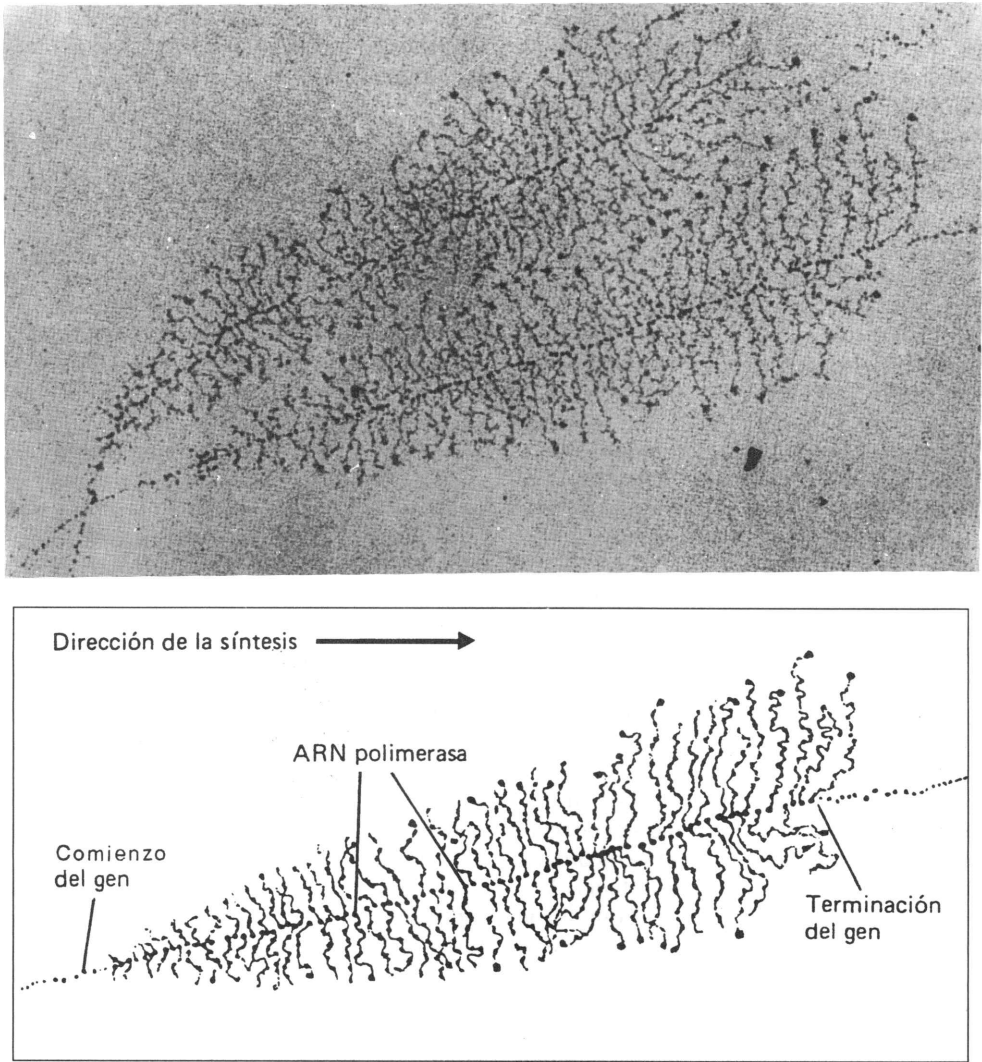


FIG. 12-4. Micrografía electrónica que muestra dos genes transcribiéndose. 35.000X. (Cortesía de O. L. Miller y B. R. Beatty.)

expuestos en la superficie de los factores de transcripción y de la secuencia de los pares de nucleótidos, respectivamente.

Originariamente se creyó que los aminoácidos de los factores de transcripción abrían la doble hélice del ADN y reconocían los grupos químicos que dan lugar a los puentes de hidrógeno que unen a las bases de los nucleótidos entre sí. Esto ha sido descartado. Si bien se confirmó que los factores de transcripción reconocen el ADN de los promotores y los reguladores por medio de esas bases, se vio que identifican a otros elementos químicos de éstas, expuestos en la *parte externa de la doble hélice*, a nivel de su *surco mayor*. Allí, sin necesidad de que se rompan los puentes de hidrógeno que unen a las dos cadenas del ADN, los aminoácidos pueden reconocer a las bases y unirse a ellas.

12-10. Los promotores y reguladores de los genes se asocian a los factores de transcripción por medio de átomos expuestos en el surco mayor del ADN

Como acabamos de ver, la región de contacto con los factores de transcripción se localiza en el lado externo de la doble hélice, a nivel del surco mayor (fig. 12-5). Visto desde este surco, cada par de nucleótidos exhibe, en las cuatro combinaciones posibles (A-T, T-A, G-C y C-G), tres átomos —uno de oxígeno, uno de hidrógeno y uno de nitrógeno— capaces de establecer uniones no covalentes (como puentes de hidrógeno) con determinados átomos de los aminoácidos que componen los factores de transcripción. Precisamente, a nivel del surco mayor los cuatro pares de bases se

distinguen entre sí porque esos tres átomos se hallan diferentemente combinados. Por ejemplo, el par A-T presenta la combinación N-H-O, y el par T-A, la combinación O-H-N. Como vemos, una es la imagen invertida (en espejo) de la otra. Algo semejante ocurre con los pares G-C y C-G, en las que los átomos forman las combinaciones N-O-H y H-O-N, respectivamente.

Además de estas asociaciones específicas, entre los factores de transcripción y el ADN se producen uniones químicas inespecíficas, una de las cuales—derivada del esqueleto de fosfatos del ADN—, si bien no le confiere especificidad a la unión, la estabiliza.

El surco menor ofrece menos posibilidades para cifrar información. Por ejemplo, visto desde el surco menor, el par A-T es prácticamente igual al par T-A. Más aún, el espacio de este surco resulta estrecho para la entrada de los aminoácidos.

En la mayoría de los casos cada factor de transcripción hace unos 20 contactos con el ADN, lo cual significa que aproximadamente 20 aminoácidos distintos interactúan con otros tantos pares de nucleótidos en cada sector promotor o regulador del gen. Dado que el número de combinaciones de pares de bases es cuatro (A-T, T-A, G-C, C-G), pueden darse unas 160.000 (20^4) posibilidades de combinaciones teóricas para formar secuencias de

nucleótidos específicas, cantidad desproporcionadamente alta en relación con el número de factores de transcripción que se estima existen en la célula.

12-11. Los tramos de los factores de transcripción que se asocian con los promotores y los reguladores exhiben unos pocos diseños en sus estructuras secundarias y terciarias

Analizadas las características estructurales del ADN, veremos cuáles singularizan a los factores de transcripción. Las proteínas de los factores de transcripción forman en algunos tramos de sus moléculas *estructuras diméricas simétricas*, las que se encastran en el surco mayor de la doble hélice ocupando dos vueltas sucesivas del ADN, un monómero en cada vuelta. En ese par de vueltas también el ADN exhibe simetría, con dos mitades de secuencias de nucleótidos repetidas en *palíndromo* (término tomado de la lingüística que refiere a la palabra o frase que se lee igual de izquierda a derecha o de derecha a izquierda). Cada una de las mitades del palíndromo ocupa una de las vueltas del ADN. Ambas condiciones, la dimerización y la simetría, facilitan la adecuación de los aminoácidos de los factores de transcripción en los tramos específicos del ADN.

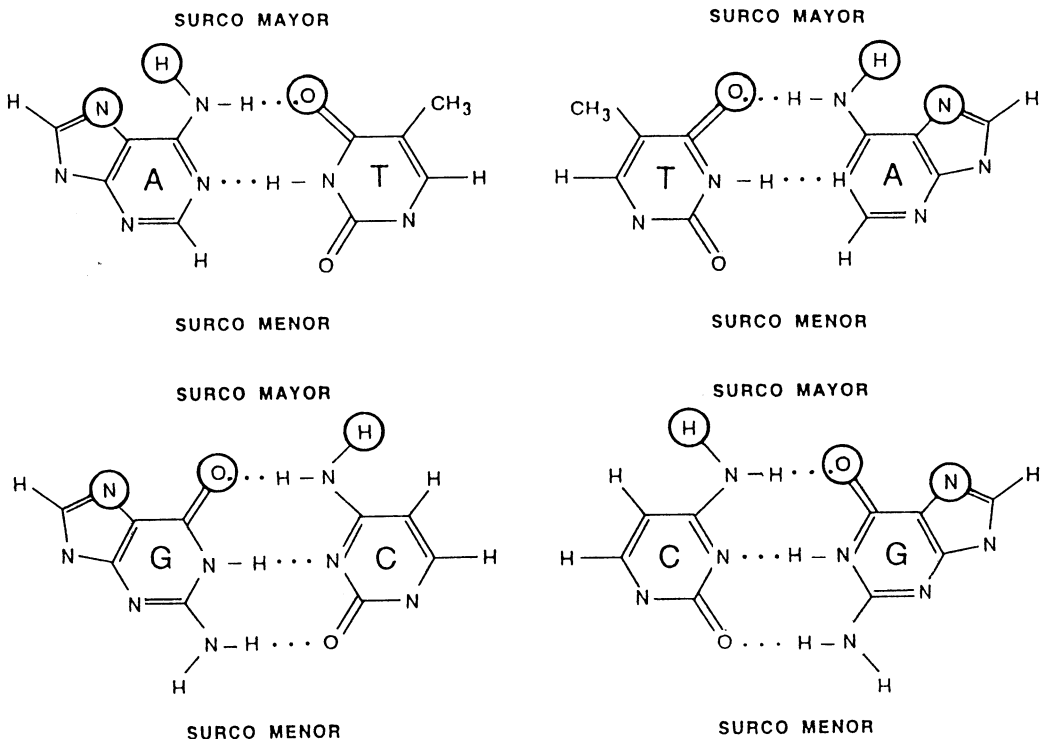


FIG. 12-5. Posiciones y combinaciones de los átomos de oxígeno, hidrógeno y nitrógeno que quedan expuestos en el surco mayor de la molécula de ADN, a nivel de los pares de bases A-T, T-A, G-C y C-G.

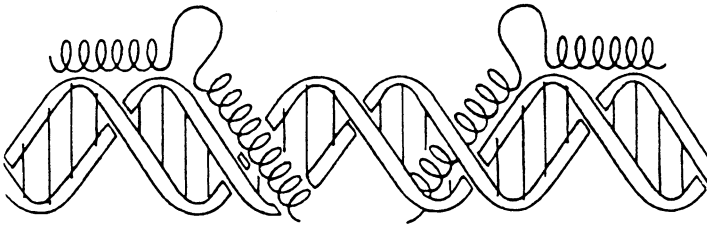


FIG. 12-6. Hélice-vuelta-hélice.

Aunque existen miles de factores de transcripción, algunos sectores de sus moléculas proteicas dan lugar a *diseños característicos* en sus estructuras secundarias y terciarias que permiten agruparlos en un número limitado de familias. Cada factor de transcripción puede tener una, dos o más de esas estructuras, cada una con su respectiva secuencia de aminoácidos singularmente diseñada para reaccionar específicamente con su contrapartida complementaria, es decir, la secuencia de ADN del sector promotor o regulador del gen que le corresponde. Sobre la base de su morfología, tales estructuras se denominan hélice-vuelta-hélice, dedos de cinc, cremallera de leucina y hélice-bucle-hélice.

Hélice-vuelta-hélice. Esta estructura consta de dos pequeñas cadenas de aminoácidos con forma de hélice, separadas por una "vuelta" de aminoácidos más corta aún (fig. 12-6). Una de las hélices "lee" la secuencia de los nucleótidos en el sector regulador del gen —al que se une si lo reconoce— y la otra mantiene la hélice lectora en la posición adecuada. Obviamente, la secuencia de nucleótidos en la hélice lectora (llamada también hélice de reconocimiento) varía en los distintos factores de transcripción. Cada hélice-vuelta-hélice se encuentra acompañada por otra similar, de modo que entre ambas componen un dímero simétrico. Las respectivas hélices de reconocimiento se encajan en el surco mayor del segmento de ADN que corresponde, una en un lado del palíndromo y la otra en el lado opuesto.

Se han identificado estructuras hélice-vuelta-hélice en los homeodominios de los factores de transcripción involucrados en el desarrollo embrionario, en los implicados en la diferenciación de las células musculares y en muchos otros.

Dedos de cinc. Cada uno está compuesto por una cadena de aminoácidos, entre los que se halla un átomo de cinc ligado tetraédricamente a cuatro cisteínas o a un par de cisteínas y otro de histidinas (fig. 12-7). La cadena de aminoácidos se proyecta como un dedo, y existe por lo general una serie repetida de copias, cuyo número varía en los distintos factores de transcripción; más aún, los dedos de cinc se asocian de a dos, formando dímeros consecutivos. Uno de los lados de cada dedo adopta la forma de una hélice, cuya secuencia de aminoácidos difiere en los distintos factores de transcripción, ya que es la que toma contacto con el ADN específico.

Los dedos de cinc son las estructuras más difundidas entre los factores de transcripción. Se encuentran, por ejemplo, en los receptores intracelulares (recordemos que estos receptores, cuando se les unen sus respectivos inductores, ingresan en el núcleo y actúan como factores de transcripción); también en el TFIIIA, uno de los factores de transcripción del ARNr 5S (sección 12-23).

Cremallera de leucina. Consiste en dos cadenas helicoidales de aminoácidos dispuestas en paralelo, cada una de las cuales posee dos sectores, uno que se une al ADN y otro que lo hace con el sector homólogo de la otra cadena de aminoácidos, con la cual forma un dímero (fig. 12-8). Los sectores proteicos unidos entre sí presentan cada siete aminoácidos —es decir, cada dos vueltas de la hélice— una leucina que mira al interior del dímero. Al parecer, las leucinas de ambos polipéptidos se encastran como dientes de un cierre relámpago, de ahí el nombre dado a esta estructura. Por su lado, los sectores polipeptídicos no dimerizados muestran una alta proporción de aminoácidos básicos. Son las secuencias de estos aminoácidos las que

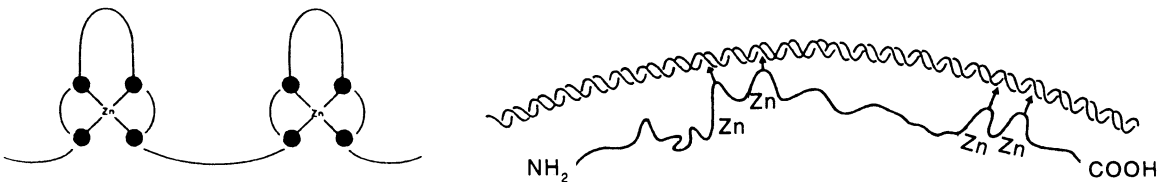


FIG. 12-7. Dedos de cinc.

generan las uniones específicas de los factores de transcripción con el ADN.

Entre otros muchos ejemplos, poseen cremalleras de leucinas los factores de transcripción que regulan la actividad de los protooncogenes *myc*, *fos* y *jun* (cap. 15-30).

Hélice-bucle-hélice. Una estructura similar a la cremallera de leucina por su disposición dimérica, pero claramente distinguible por la composición de sus cadenas helicoidales, se da en el diseño llamado hélice-bucle-hélice, que no debe confundirse con la estructura hélice-vuelta-hélice. Aquí también cada monómero contiene dos sectores, uno utilizado para la dimerización y otro específico (rico en aminoácidos básicos) reservado para la unión de los factores de transcripción con el ADN (fig. 12-9).

12-12. El enrollamiento de la cromatina influye sobre la actividad génica

Aunque puede no ser necesariamente cierto que la transcripción sólo tenga lugar en la *euromatina*, casi todos los datos indican que el empaquetamiento altamente condensado de la cromatina durante la interfase —es decir, la *heterocromatina*— denuncia una ausencia de actividad transcripcional en su ADN. Ello no implica que en la relativamente extendida euromatina se produzca automáticamente la transcripción. En efecto, en una célula dada la mayor parte de la euromatina se halla inactiva, ya que se transcriben sólo los genes que reciben el mandato de hacerlo (vía factores de transcripción), como vimos en la sección anterior.

En el capítulo 10-9 analizamos el papel de las histonas en el enrollamiento de la cromatina. Veremos ahora cómo influyen en la transcripción de los genes, teniendo en cuenta que esta función requiere la presencia de un ADN relativamente desenrollado y en lo posible sin elementos adosados que puedan obstaculizar la acción de la ARN polimerasa.

Se acepta que la cromatina en la configuración de 10 nm es la más apta para la transcripción (fig. 10-10). No obstante, para que la ARN polimerasa pueda actuar, el ADN debe reacomodarse a nivel de los *nucleosomas*, al menos localmente y mientras dura la transcripción. Se ha propuesto que los factores de transcripción basales, al interactuar con los elementos situados en el promotor, además de las consecuencias anteriormente analizadas provocan el desplazamiento de las histonas en ese sector del gen, lo que permite la separación local de las dos cadenas del ADN por parte de la ARN polimerasa y con ello el comienzo de la transcripción. Al parecer los factores de transcripción actúan —directa o indirectamente— sobre la histona H4, cuyo cambio desencadena la remoción de las restantes histonas nucleosómicas, comenzando por las H2A y H2B. A continuación, a medida que la ARN polimerasa se desplaza por la cromatina, le correspondería a la enzima actuar sobre los sucesivos nucleosomas que se le ponen al paso, removiéndolos también. Finalmente, los nucleosomas afectados se recomponen en los segmentos ya transcritos, conforme la ARN polimerasa los va dejando atrás.

Algunos datos resaltan la importancia de las histonas en la regulación de la transcripción. Por ejemplo, la cromatina menos enrollada, correspondiente al ADN activo, posee histonas nucleosómicas asociadas a *grupos acetilo*, lo cual es mucho menos frecuente en las histonas de la cromatina inactiva. La adición de los grupos acetilo a las histonas es catalizada por una *acetiltransferasa*, y de su remoción es responsable una *desacetilasa*; ambas enzimas han sido detectadas en la matriz nuclear. Además, la histona H2B se halla más fosforilada en la cromatina activa que en la inactiva.

Es probable que la fosforilación y la acetilación de las histonas prevengan el empaquetamiento de la cromatina, con la consecuente inactivación de su ADN.

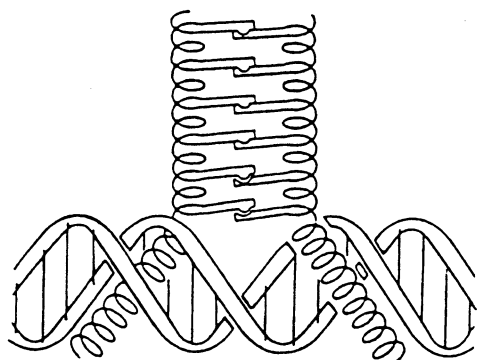


FIG. 12-8. Cremallera de leucina.

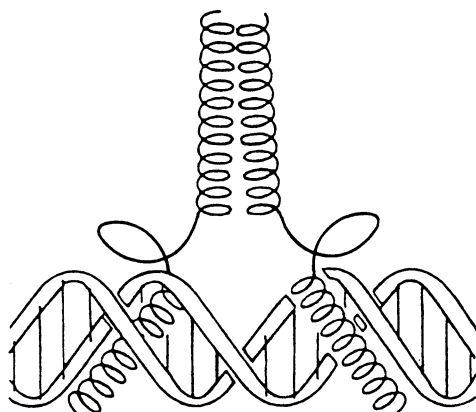


FIG. 12-9. Hélice-bucle-hélice.

Por otra parte, no se descarta que algunos de los lazos formados al enrollarse la fibra de cromatina de 30 nm puedan constituir verdaderas unidades de transcripción, de modo que cada lazo corresponda a un tramo de ADN representativo de un gen (cap. 10-9) (fig. 10-10).

Respecto de la heterocromatina, es posible la existencia de factores que determinen su formación y estabilidad. Tal idea se halla abonada por el hecho de que en las células que se dividen esa fracción de la cromatina es *heredada* por las células hijas —de generación en generación— con el mismo grado de enrollamiento. El ejemplo más conocido corresponde a uno de los cromosomas X en las células de la mujer (el *cuerpo de Barr*), cuya cromatina se presenta heterocromática en todo el cromosoma (excepto en algunos sectores) durante toda la vida (salvo en las dos primeras semanas del desarrollo embrionario) en las mujeres que exhiben en sus cariotipos dos cromosomas X por lo menos.

12-13. La metilación del ADN influye sobre la actividad génica

Además de las cuatro bases conocidas, en algunos puntos el ADN contiene una quinta —la *metilcitosina* (mC)—, que se genera por el agregado de un grupo metilo (CH_3) a la citosina (fig. 12-10). La metilación se halla restringida a citosinas seguidas de guaninas (no estamos diciendo “apareadas”), de modo que si en un punto del ADN una de sus cadenas contiene el dinucleótido mCG, la opuesta exhibirá el dinucleótido GmC. Como es obvio, la mC del dinucleótido mCG se aparea con la G del dinucleótido GmC, y la G del primer dinucleótido con la mC del segundo.

Se ha comprobado la existencia de una estrecha correlación entre el grado de metilación de los genes y su inactividad transcripcional. No obstante, en la inactivación de un gen influye menos el número de metilaciones que el lugar en que se encuentran. En efecto, la metilación del ADN a nivel del promotor puede abolir la actividad de un gen,

mientras que muchas metilaciones en su región codificadora suelen no afectarla.

Recordemos que existen genes con promotores que presentan sectores llamados “regiones CG”, debido a que exhiben un alto número de tales dinucleótidos (cap. 11-7). Concordantemente, los promotores de muchos genes inactivos pertenecientes al cromosoma X condensado (en las células de las mujeres) se hallan metilados a nivel de esos dinucleótidos.

Como es de esperar, un gen puede estar metilado en un tipo celular pero no en otro. El gen de la β -globina, por ejemplo, se halla metilado en las células que no elaboran esa proteína. En cambio, en las células eritropoyéticas, donde la β -globina es producida en grandes cantidades, este gen se encuentra pobremente metilado.

Después de la división celular, en los tejidos diferenciados, las mC suelen permanecer metiladas en las sucesivas generaciones de células, en forma equivalente a lo que sucede con las C, que se mantienen sin metilar. La *herencia* de las mC (y de las C no metiladas) se debe a que durante la replicación del ADN, al duplicarse cada una de sus dos cadenas, las C de las cadenas hijas —las complementarias a las G de los dinucleótidos mCG y GmC, exclusivamente— adquieren un grupo metilo, participando en esta metilación una enzima llamada *metilasa de mantenimiento* (fig. 12-11). Opuestamente, en las células que se diferencian luego de dividirse, los patrones de metilación de las C se modifican, de modo que los genes inactivos —y por lo tanto muy metilados— al activarse pierden parte de su metilación. El mecanismo que modula el reemplazo de citosinas metiladas por citosinas sin metilar durante la diferenciación celular, y el modo como las primeras previenen la transcripción, son temas que plantean grandes desafíos a los investigadores en el campo de la biología molecular.

12-14. En la impronta genómica el patrón de metilación de algunos genes homólogos es distinto según el cromosoma provenga de la madre o del padre

Un fenómeno llamativo se da en la denominada *impronta genómica*, en la que el patrón de metilación de algunos genes correspondientes a determinados pares de cromosomas homólogos es distinto según que el cromosoma haya sido aportado por el padre o por la madre. Como consecuencia de esa desigualdad, tales genes se expresan en forma diferente. La impronta genómica se establecería durante la espermatogénesis y la ovogénesis. Así, en las células germinativas se producirían modificaciones en la metilación de los cromosomas según el sexo del individuo, de modo que en los esper-

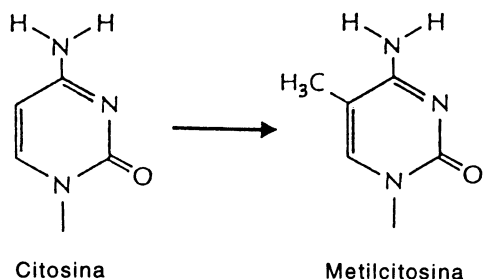


FIG. 12-10. Metilación de la citosina.

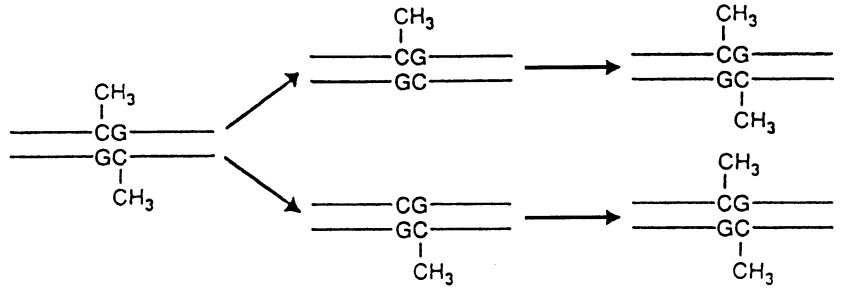


FIG. 12-11. Metilación de las citosinas tras la replicación del ADN.

matogonios los genes aportados por la madre tomarían una *impronta masculina*, mientras que en los ovogonios los genes provenientes del padre tomarían una *impronta femenina*. Se ignora qué factores, en el testículo y en el ovario, dan lugar a estas singularidades.

Aunque los mecanismos implicados en la impronta genómica no han sido descubiertos, seguramente afectan a genes con funciones cruciales para el desarrollo embrionario de los mamíferos, lo cual explica por qué es impracticable su gestación a partir de ovocitos a los que se les extrae el núcleo haploide y se lo reemplaza por dos pronúcleos femeninos, o por dos masculinos. Este y otros indicios sugieren que para el desarrollo embrionario correcto es imprescindible que la célula huevo reciba una proporción 1:1 de alelos paternos y maternos.

Modelos naturales de impronta genómica se dan en las afecciones congénitas derivadas de la presencia en el genoma de una *disomía uniparental*, en la que ambos alelos de un gen con impronta son heredados del padre o de la madre, y no un alelo de cada uno como ocurre normalmente. Por

ejemplo, el *síndrome de Prader-Willi* se debe a la existencia de una disomía uniparental en la que los dos alelos de uno de los genes del cromosoma 15 son de origen materno. Su contrapartida es el *síndrome de Angelman*, en el que tales alelos son paternos. Ambos síndromes, a pesar de tener su origen en un mismo gen, dan lugar a cuadros clínicos absolutamente diferentes.

PROCESAMIENTO DEL ARN MENSAJERO

Una vez que el transcrito primario ha sido sintetizado comienza a experimentar algunas modificaciones postranscripcionales, agrupadas bajo el nombre de *procesamiento del ARNm* (fig. 12-12).

12-15. En el extremo 5' del ARNm se agrega un nucleótido metilado llamado *cap*

El cap (o capuchón) es un nucleósido metilado —la 7-metilguanosina— que se liga al nucleósido trifosfato del extremo 5' del ARNm naciente por medio de los siguientes pasos.

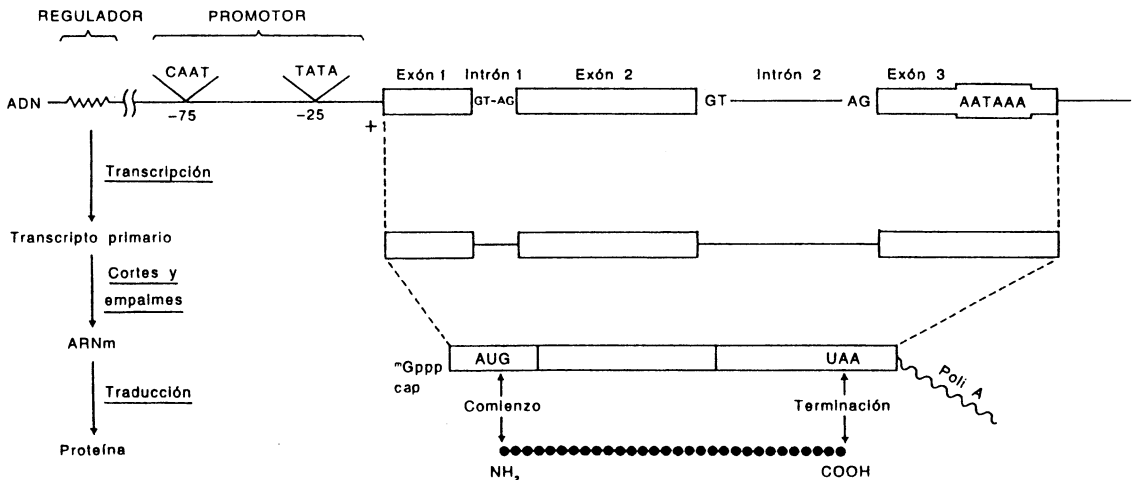


FIG. 12-12. Esquema de los genes que codifican ARNm; se muestran los segmentos correspondientes al regulador, el promotor y el codificador, este último con exones e intrones. Obsérvense los cambios que experimenta el ARNm luego del procesamiento del transcrito primario.

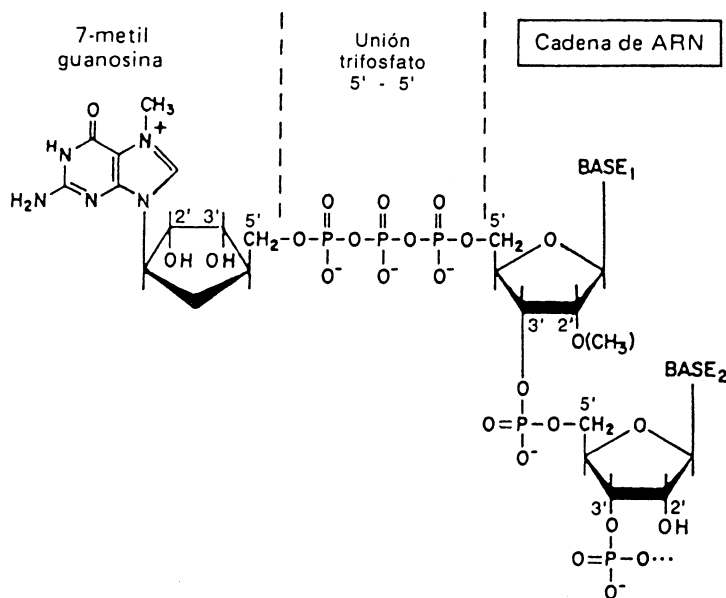


FIG. 12-13. Formación y estructura química del cap (capuchón) en el extremo 5' del ARNm. Obsérvese que la 7-metilguanosa se liga al primer nucleótido del ARNm mediante una unión 5'-5' trifosfato.

En primer lugar, una enzima específica incorpora una *guanosina trifosfato* (GTP) al extremo 5' del transcripto. Esta reacción es diferente de la generada por la ARN polimerasa II en tres aspectos: 1) el nucleósido se agrega en el extremo 5' de la cadena y no en el extremo 3'; 2) se establece entre los nucleótidos una unión trifosfato —no una unión fosfodiéster— en la que uno de los P es aportado por el GTP y los dos restantes por el nucleósido trifosfato del ARNm, y 3) la unión trifosfato liga el C5' de una de las ribosas con el C5' de la otra, y no un C5' con un C3', como en los ácidos nucleicos. Dado que el nucleósido del cap queda invertido, el extremo 5' del ARNm se convierte en un segundo extremo 3'. A continuación otra enzima, la *metiltransferasa*, toma dos grupos metilo de una molécula donante —la *S-adenosilmetionina*— y los transfiere al ARNm, uno a la guanina del cap (fórmase así la 7-metilguanosa) y el otro al que ha pasado a ser, luego de la incorporación de la guanina, el segundo nucleótido del ARNm (fig. 12-13).

El cap evita la degradación del extremo 5' del ARNm por fosfatasas o nucleasas, y es requerido durante la remoción de los intrones (sección 12-17). Como se verá en el próximo capítulo (13-5 y 13-11), también participa en el arribo del ARNm al citoplasma y en la unión del ARNm a los ribosomas, por lo cual es necesario durante el comienzo de la traducción.

Debe advertirse que el cap se une al transcripto primario apenas éste comienza a sintetizarse —cuando su cadena no ha alcanzado los 30 nucleótidos—, de manera que su incorporación no es postranscripcional sino cotranscripcional.

12-16. El extremo 3' del ARNm se poliadenila

Lleva el nombre de *poliadenilación* el agregado de una secuencia de aproximadamente 250 adeninas —llamada *poli A*— en el extremo 3' del ARNm. Dado que en los genes que codifican ARNm no existe una secuencia de terminación de 250 timinas seguidas para dar lugar a la poli A, las mencionadas adeninas se agregan al ARNm de la siguiente manera (fig. 12-14).

Poco antes de que la transcripción alcance la secuencia de terminación del gen, una endonucleasa específica reconoce en el transcripto primario la secuencia AAUAAA, llamada *señal de poliadenilación* (cap. 11-7). La enzima corta la molécula del ARNm unos 20 nucleótidos después de tal señal, tras lo cual el transcripto primario se libera del ADN. No obstante, el resto del gen continúa transcribiéndose, hasta arribar la ARN polimerasa II a la secuencia de terminación (como vimos en el capítulo 11-7, en los genes de los ARNm esta secuencia aún no ha sido descubierta). El tramo adicional de ARNm que resulta no tarda en degradarse por la acción de fosfatasas y nucleasas, dado que no se incorpora un cap en su extremo 5'. Entre tanto, otra enzima, la *poli A polimerasa*, fue agregando, de a una por vez, las 250 adeninas en el extremo 3' del recientemente liberado transcripto primario. Como vemos, la poli A polimerasa se diferencia de la ARN polimerasa II en que no requiere un molde de ADN para incorporar nucleótidos.

A semejanza del cap, la poli A es necesaria para proteger el extremo 3' del ARNm de la degradación enzimática, y ayuda al ARNm a salir del núcleo.

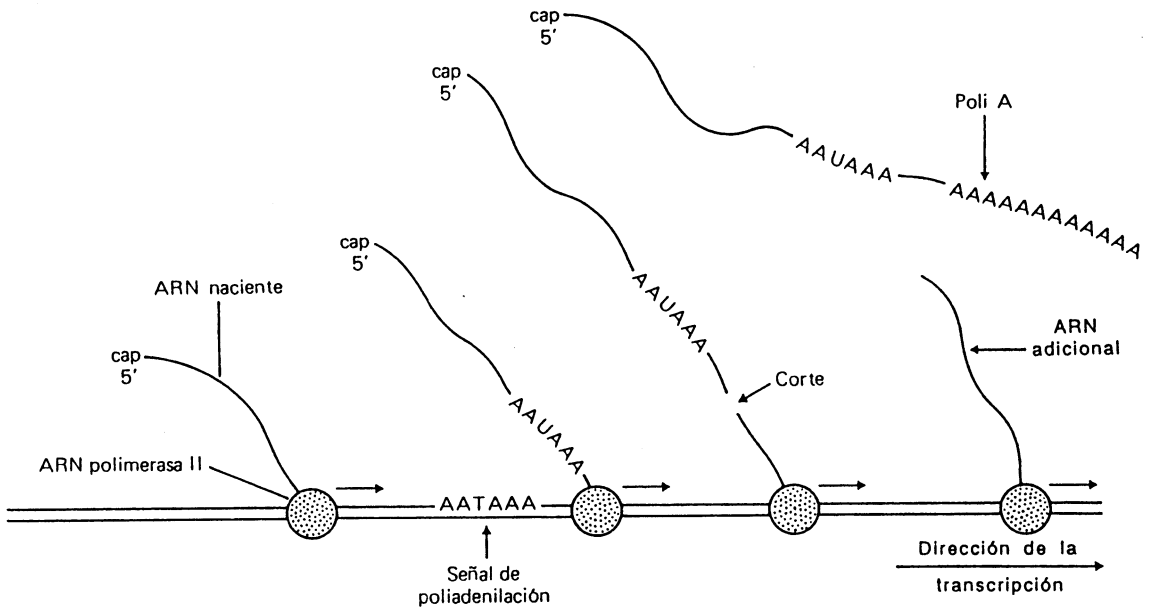


FIG. 12-14. Poliadenilación del extremo 3' del ARNm, antes de que culmine el proceso de transcripción. Nótese que el extremo 5' del ARNm ya posee el cap.

En los ARNm encargados de codificar a las *histonas*, el extremo 3' no se poliadenila. No obstante, ese sector también contiene una estructura vinculada con la protección de la molécula, consistente en una corta secuencia de nucleótidos que al plegarse adquiere la forma de un bucle (fig. 12-15).

12-17. Las moléculas de los ARNm experimentan cortes y empalmes

El proceso por el cual se remueven los *intrones* del transcripto primario se cumple en dos pasos, mediante los cuales el ARNm es cortado entre los intrones y los exones, y los exones se empalman entre sí previo descarte de los intrones. Antes de analizar cómo se lleva a cabo este proceso haremos una breve descripción de los principales agentes responsables de su ejecución, y nos referiremos a las señales que esos agentes deben reconocer en el transcripto primario para poder realizar su trabajo.

Los agentes responsables de los *cortes* y los *empalmes* del ARN son unas pequeñas ribonucleoproteínas nucleares llamadas *RNPsn* (cap. 11-3), cada una de las cuales está compuesta por un pequeño ARN nuclear rico en uridinas (de 250 nucleó-

tidos o menos) y varias proteínas (fig. 12-16). Los ARN de las *RNPsn* se sintetizan bajo la dirección de la ARN polimerasa II.

Existen varios tipos de *RNPsn*, diferentes no sólo en su composición sino también en sus funciones, en algunos casos ajenas al corte y empalme del ARNm. Las *RNPsn* que participan en el corte y empalme del ARNm son las llamadas U1, U2, U4, U5 y U6 ("U" por las uridinas), las cuales se combinan entre sí en torno del sector del transcripto primario que habrán de procesar, formando un complejo macromolecular denominado *spliceosoma*. Por su lado, otra *RNPsn*, la U11, interviene en la antes analizada poliadenilación del extremo 3'

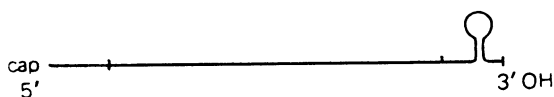


FIG. 12-15. Formación de un bucle o asa en el extremo 3' del ARNm de las histonas.

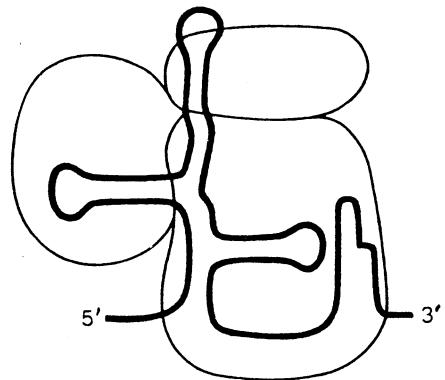


FIG. 12-16. Una de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (*RNPsn*), compuesta por un ARN nuclear pequeño (*ARNsn*) rico en uridinas y tres complejos proteicos.

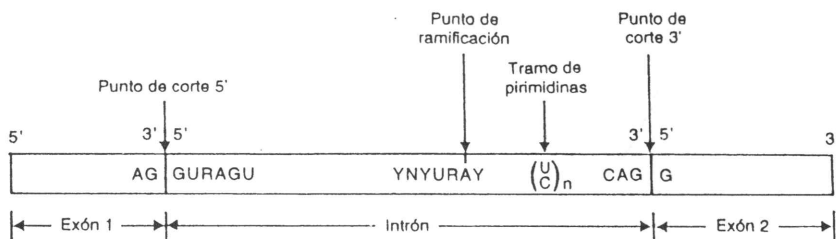


FIG. 12-17. Secuencia de nucleótidos en los intrones y exones responsables de los procesos de cortes y empalmes (*splicing*) en el transcrito primario.

de los ARN mensajeros, excepto en el ARNm de las histonas, cuyo extremo 3', al ser procesado por la RNPs_n U7, desarrolla un bucle. Más adelante analizaremos las funciones de las RNPs_n U3, U8 y U13 en el procesamiento de los ARNr 45S.

Es posible que los pequeños ARN de las RNPs_n, y no sus proteínas, sean los responsables de la actividad enzimática que muestran esas estructuras. La sospecha se debe a que en algunos organismos —por ejemplo el bacteriófago T4 y el protozoo *Tetrahymena thermophila*— se han identificado pequeñas moléculas de ARN con evidentes propiedades catalíticas.

El transcrito primario contiene una serie de *marcas particulares* que señalan dónde ha de cortarse su molécula (fig. 12-17). Así, en el límite entre el extremo 3' de los exones y el extremo 5' de los intrones aparece la secuencia exón-AG|GURAGU-intrón, en la que el trinucleótido GUR inicia la secuencia intrónica y la letra R representa a una purina. En el otro límite, es decir, entre el extremo

5' de los exones y el extremo 3' de los intrones, suele hallarse la secuencia intrón-CAG|G-exón, en la que el trinucleótido CAG da fin a la secuencia intrónica. Dado que por fuera de los intrones suelen encontrarse otros trinucleótidos GUR y CAG, por sí solos no bastan como marcas y deben ser complementados por señales adicionales. Así, dentro del intrón, cerca de su extremo 3', existe un tramo rico en pirimidinas, y algo más lejos, otro constituido por los nucleótidos YNYURAY, en el que Y representa a una pirimidina, R a una purina y N a cualquiera de los cuatro nucleótidos. La U y la A se presentan en forma constante. Como veremos, esta A desempeña un papel crucial en el corte de los intrones; es identificada con el nombre de *punto de ramificación*.

Veamos ahora cómo se produce la remoción de los intrones y el empalme de los exones, en dos etapas (fig. 12-18).

En la primera etapa la RNPs_n U1 se combina con el ARN a nivel del extremo 5' del intrón y la

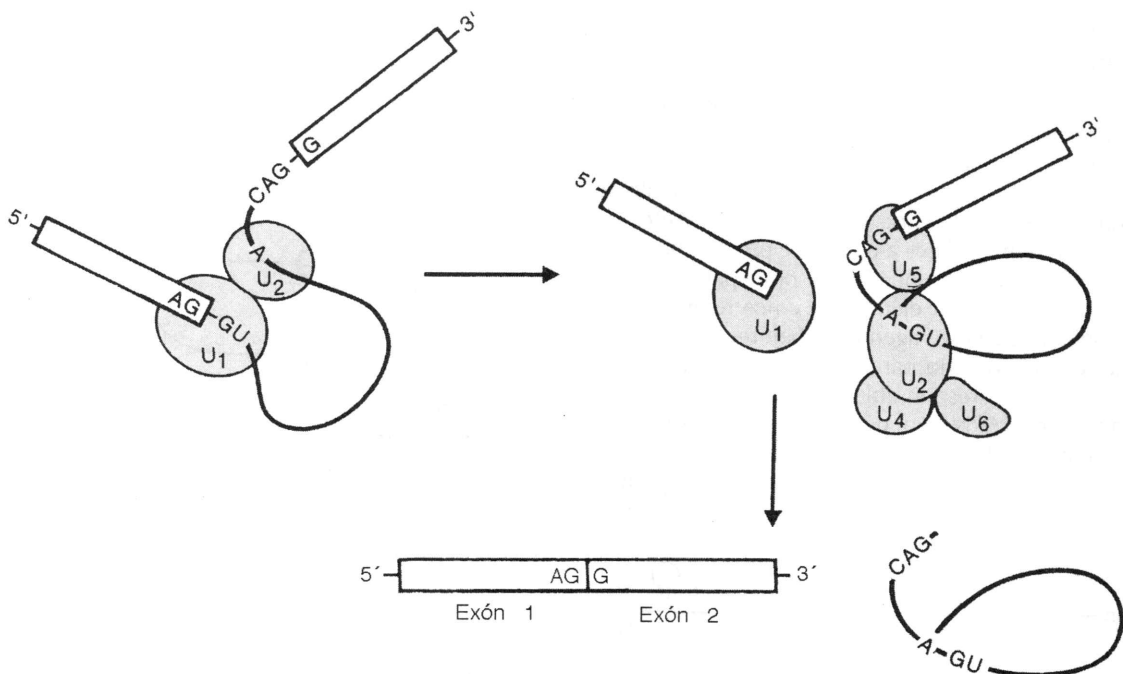


FIG. 12-18. Remoción de un intrón y empalme de los exones vecinos con la ayuda de las RNPs_n U1, U2, U4, U5 y U6.

RNPsn U2 con el tramo de ARN adyacente al punto de ramificación. Esta última asociación, además de energía —que es tomada del ATP—, depende de la presencia del sector rico en pirimidinas. La RNPsn U1 corta al ARN entre el extremo 3' del exón y el extremo 5' del intrón, lo cual le permite a este último doblarse sobre sí mismo hasta formar un lazo. De inmediato la RNPsn U6 asistida por la RNPsn U4 se asocia al extremo 5' (libre) del intrón e induce a la G situada en ese extremo a que se ligue con la A del punto de ramificación, previo contacto de la RNPsn U6 con la RNPsn U2. La RNPsn U6 cataliza la formación de una inusual unión fosfodiéster, ya que el C5' de la guanina no se liga al C3' sino al C2' de la adenina. Dado que la A retiene en sus flancos sus dos uniones fosfodiéster originales (la 3'→5' de un lado y la 5'→3' del otro), presenta tres de esas uniones en lugar de dos, y de ahí el nombre de “punto de ramificación”. Como se aprecia en la figura 12-18, esta etapa culmina dejando un exón libre y un lazo compuesto por el intrón y el exón subsiguiente.

La segunda etapa es protagonizada por la RNPsn U5 y también requiere energía. Luego de asociarse esta RNPsn al ARN correspondiente al extremo 3' del intrón, lo corta en el punto en que se une el intrón con el exón y empalma a éste con el exón liberado en la etapa anterior. El intrón, que persiste como un lazo asociado al espliceosoma, es finalmente removido.

Para que tengan lugar las reacciones de corte y empalme por parte de las RNPsn es necesaria la presencia del cap en el extremo 5' del transcripto primario. Por lo contrario, dado que tales reacciones pueden producirse sin que se haya completado la síntesis del transcripto, no exigen la poliadenilación de su extremo 3'. En algunos casos el proceso se completa en segundos, en tanto que en otros tiene una duración de más de 20 minutos. Debe señalarse que el ARNm puede atravesar los poros de la envoltura nuclear y salir al citoplasma sólo si ha sido completada la remoción de los intrones del transcripto primario.

Una de las enfermedades autoinmunes que afecta al hombre —el *lupus eritematoso*— se genera por la producción de anticuerpos contra determinadas proteínas de las RNPsn del espliceosoma.

12-18. Algunas adeninas del ARNm se metilan

Antes de abandonar el núcleo, la mayor parte de los ARNm son metilados. Los grupos metilo son incorporados al N6' de ciertas adeninas (el 0,1% de éstas). Dado que este tipo de metilación se produce exclusivamente en los exones, es posible que los grupos metilo tengan una función protectora en los segmentos sobrevivientes del transcripto primario.

REGULACION DEL PROCESAMIENTO DE LOS ARN MENSAJEROS

12-19. El procesamiento de los ARNm es regulado en varios niveles

Vimos que el control de la transcripción de los genes, operado a través de los promotores y los reguladores, es el mecanismo más importante que utiliza la célula para establecer qué tipos de proteínas ha de producir y en qué cantidades. No obstante, para controlar la producción de algunas proteínas existen mecanismos accesorios —postranscripcionales— de no menor importancia. Desde el punto de vista cronológico, los primeros en operar tienen lugar en el interior del núcleo, en algunos casos a través de la regulación del procesamiento del transcripto primario y en otros mediante el control de la salida del ARNm al citoplasma. De estos mecanismos nos ocuparemos de inmediato, quedando para el próximo capítulo el análisis de los procesos regulatorios posteriores a dicha salida, es decir, los que se dan a partir del momento en que los ARNm han arribado al citoplasma.

Corte y poliadenilación diferencial del extremo 3' del transcripto primario. Algunos genes, por ejemplo, los que codifican anticuerpos en los linfocitos B, generan un transcripto primario que puede dar lugar, alternativamente, a dos proteínas semejantes, aunque una más larga que la otra. Ello se debe a que un factor regulatorio (no conocido) determina que el corte del ARN en el extremo 3' del transcripto primario —y por ende el agregado de la poli A— se realice, de acuerdo con las necesidades de la célula, en forma alternada en dos lugares diferentes de la molécula, lo cual genera dos ARN mensajeros de distinta longitud.

En el ejemplo citado, uno de los ARNm da lugar a una proteína que se segrega (anticuerpo) y el otro a una proteína de mayor longitud cuya parte añadida sirve para anclar el anticuerpo a la membrana plasmática del linfocito, en la que cumple funciones de receptor (cap. 18-25) (fig. 18-14).

Cortes y empalmes en lugares alternativos del transcripto primario. Los cortes en el ARN del transcripto primario deben ser llevados a cabo con absoluta precisión, pues bastaría que el punto de incisión se corriera un solo nucleótido para alterar la construcción de los sucesivos codones en el ARNm e inutilizar su mensaje. Más aún, la presencia de intrones convierte al transcripto primario en una molécula bastante versátil, que podría ser cortada y empalmada de diferentes maneras para dar lugar a ARN mensajeros distintos y por ende a varias clases de proteínas; no obstante, los casos de cortes y empalmes alternativos son poco frecuentes. Puede ocurrir que uno o más exones sean removidos (con el resultado de ARNm más cortos) o

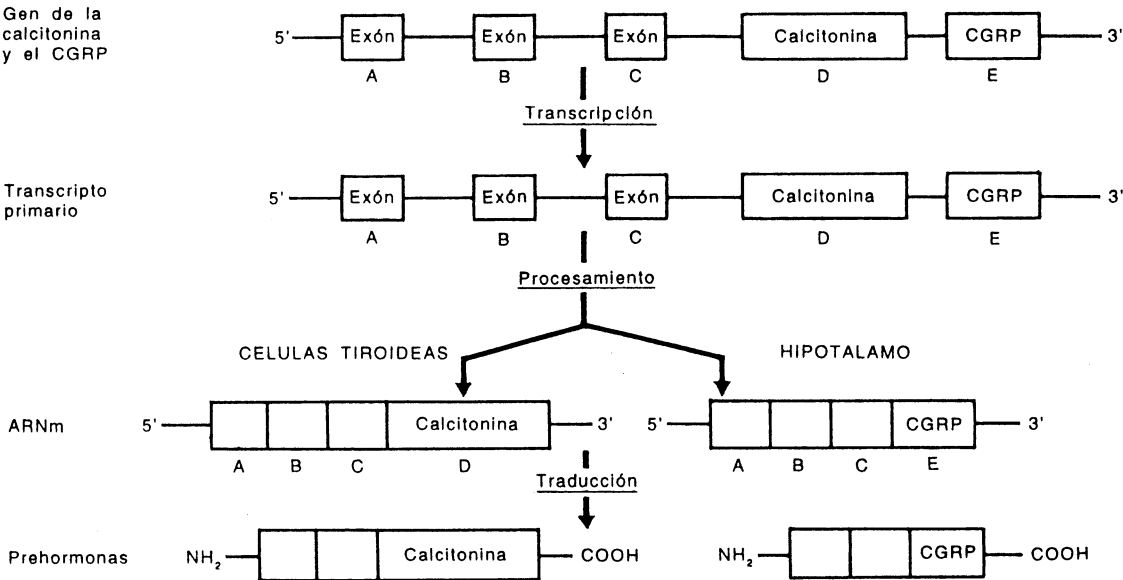


FIG. 12-19. Procesamiento alternativo del transcripto primario del gen de la calcitonina y el CGRP. Se sintetiza uno u otro producto según el tipo celular. (De S. Amara y col., 1982.)

que uno o más intrones no sean excluidos (y quedan como partes de los ARNm definitivos). Así, un mismo transcripto primario es capaz de generar dos o más clases de proteínas y accidentalmente algunas ajenas a la célula.

Un fenómeno singular se observa en las células parafoliculares de la tiroides y en un tipo de neuronas del hipotálamo, ya que ambas producen, entre otros, un transcripto primario común prácticamente idéntico (fig. 12-19). No obstante, según el tipo de célula varían los puntos en que se producen los cortes y empalmes; en ambos tipos celulares es removido uno de los exones, pero no el mismo. Como resultado, en las células parafoliculares de la tiroides se produce el ARNm que da lugar a la hormona *calcitonina* y en las neuronas el ARNm que codifica a la proteína *CGRP* (por *calcitonin gene-related product*).

Control de la salida de los ARNm al citoplasma. Se ha postulado, aunque no probado, que ciertos ARNm no pasan al citoplasma debido a que son degradados selectivamente en el núcleo, o porque —selectivamente también— se halla impedida

su salida por los poros de la envoltura nuclear. Este mecanismo regulatorio se produciría en las células cuyos citoplasmas advierten que necesitan prescindir de tales ARNm apenas fueron sintetizados.

ARN RIBOSOMICO 45 S

12-20. Los genes que codifican el ARNr 45 S son activados por factores de transcripción

La iniciación de la síntesis del ARNr 45S por la ARN polimerasa I requiere por lo menos dos factores de transcripción, los llamados SL1 (por *selectivity factor*) y UBF (por *upstream binding factor*) (fig. 12-20). Los estudios sobre el SL1 revelaron que contiene una subunidad idéntica al TBP del TFIID (a pesar de que el promotor del gen para el ARNr 45S carece de secuencia TATA) más 3 TAFs. El SL1 se asocia al promotor de gen y el UBF a la secuencia reguladora (amplificadora) (cap. 11-8). Luego el SL1 y el UBF se comunican entre sí —y ambos con la ARN polimerasa I— para formar un complejo cooperativo que da inicio a la transcripción.

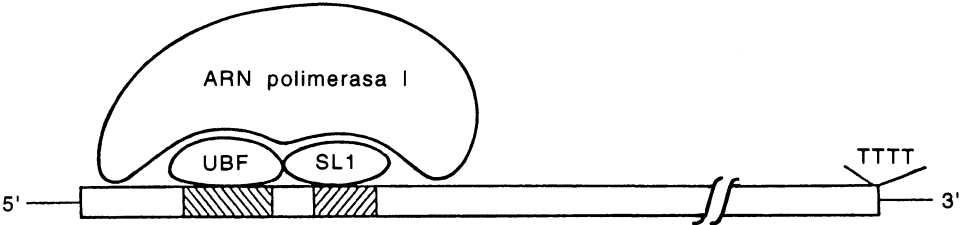


FIG. 12-20. Representación del ARNr 45 S, asociado a los factores de transcripción UBF y SL1 y a la ARN polimerasa I.

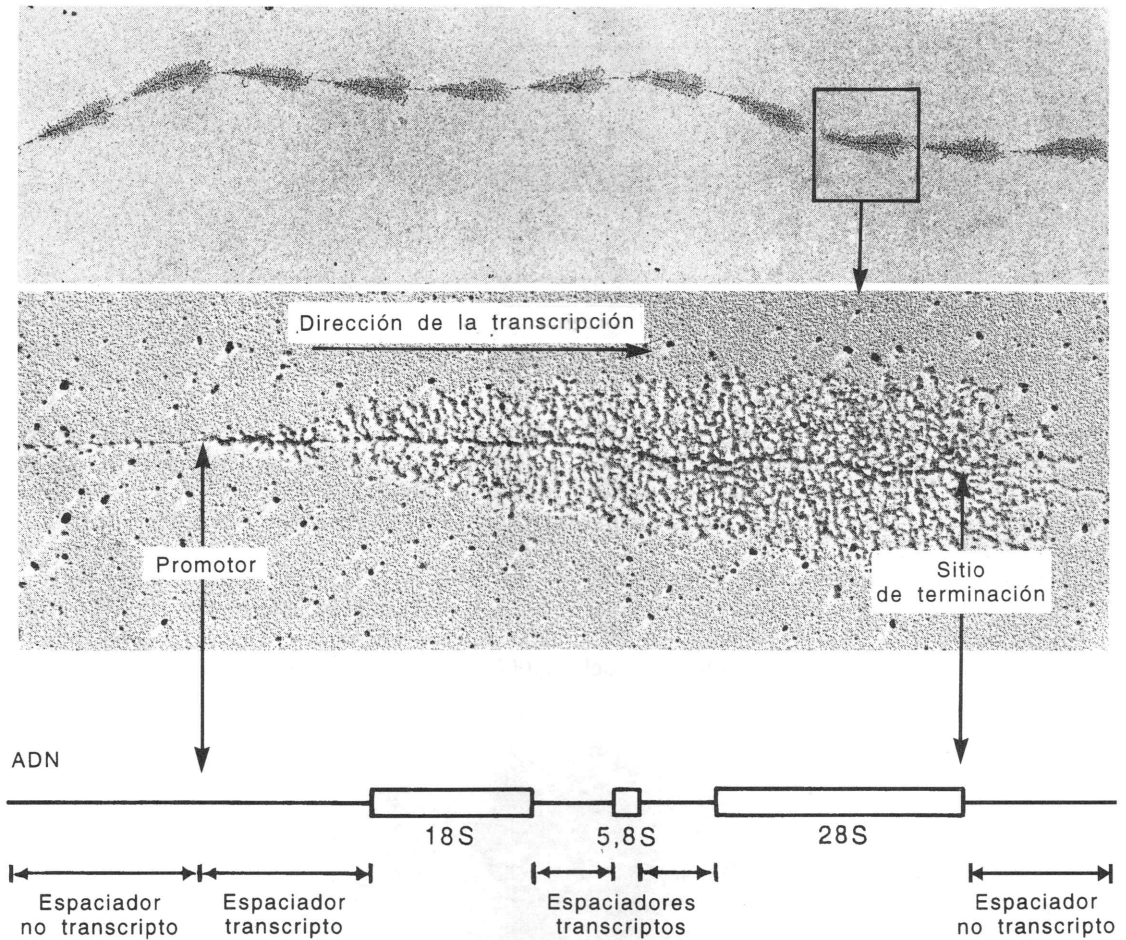


FIG. 12-21. En la parte superior de la figura se observa un extendido con once genes consecutivos del ARNr 45 S, separados por segmentos espaciadores que no se transcriben. En la parte media aparece uno de dichos genes con mayor aumento en pleno proceso de transcripción; contiene múltiples moléculas de ARNr 45 S, lo que le da un aspecto de "árbol de navidad". En la parte inferior se muestra un esquema del gen, con las partes correspondientes a los ARNr 18S, 28S y 5,8S junto a los segmentos espaciadores que se transcriben. (Cortesía de U. Scheer, M. F. Trendelenburg y W. W. Franke.)

La transcripción de cada gen del ARNr 45S concluye al arribar la ARN polimerasa I a la secuencia de terminación, rica en timinas. Dado que los genes del ARN 45S se hallan alineados en tándem, es posible que exista algún tipo de asociación entre la zona de terminación de un gen y la zona de iniciación del gen siguiente, a pesar de estar separadas por un tramo de ADN espaciador que no se transcribe. Abonan esta idea experimentos en los que la transcripción de un gen no se inicia si el ubicado precedentemente no finaliza la suya.

El estudio ultramicroscópico del nucléolo, previo extendido de sus componentes, muestra una sucesión de genes del ARNr 45S —dispuestos en tándem—, cada uno asociado a sus respectivos transcritos primarios. Forman estructuras con aspecto de *árbol de navidad*, similares a las de los genes que sintetizan ARNm a alta velocidad (fig. 12-21).

12-21. El procesamiento del transcripto primario del ARNr 45S es diferente del de los ARNm

El transcripto primario del ARNr 45S no forma cap en su extremo 5' ni se poliadenila su extremo 3'. Su procesamiento, mostrado en la figura 12-22, consiste en una serie ordenada de cortes, hasta quedar los ARNr 28S, 18S y 5,8S como unidades independientes. El origen de los ARNr 28S, 18S y 5,8S a partir de un mismo transcripto primario asegura su producción equitativa. Las *secuencias espaciadoras* del transcripto primario son digeridas por enzimas específicas, conforme van siendo separadas de las secuencias utilizables. Estas últimas son metiladas antes de ser cortado el transcripto primario. Así, unos 100 grupos metilo se unen a las bases o a las ribosas de otros tantos nucleótidos pertene-

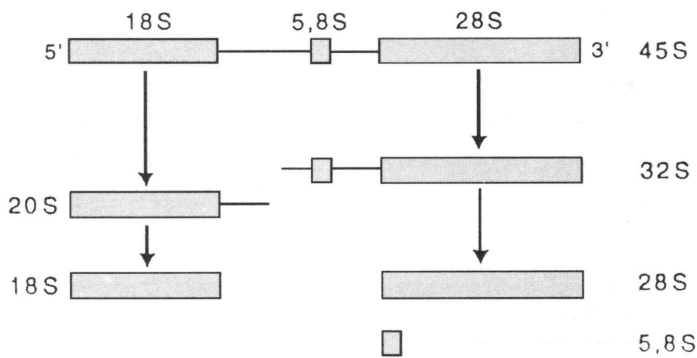


FIG. 12-22. Procesamiento del ARNr 45 S, que da lugar a los ARNr 18 S, 28 S y 5,8 S.

cientes a los sectores 28S, 18S y 5,8S. Como ocurre con la metilación del ARNm, es posible que los grupos metilo en el ARNr 45S tengan por función proteger a los sectores sobrevivientes del transcrito primario.

El procesamiento del ARNr 45S incluye, además, la asociación y el ensamblado de distintas proteínas con los ARNr 28S, 18S y 5,8S (cap. 13-8). Tales *proteínas ribosómicas*, provenientes del

citoplasma, se asocian al ARNr 45S mientras éste se sintetiza, es decir, antes de ser cortado y de ser separados unos de otros sus tres componentes. En este proceso intervienen las RNPsn U3, U8 y U13.

La enorme cantidad de ribosomas que necesita la célula es abastecida holgadamente merced a las 200 copias del gen que codifica el ARNr 45S (y las 2.000 copias del gen del ARNr 5S).

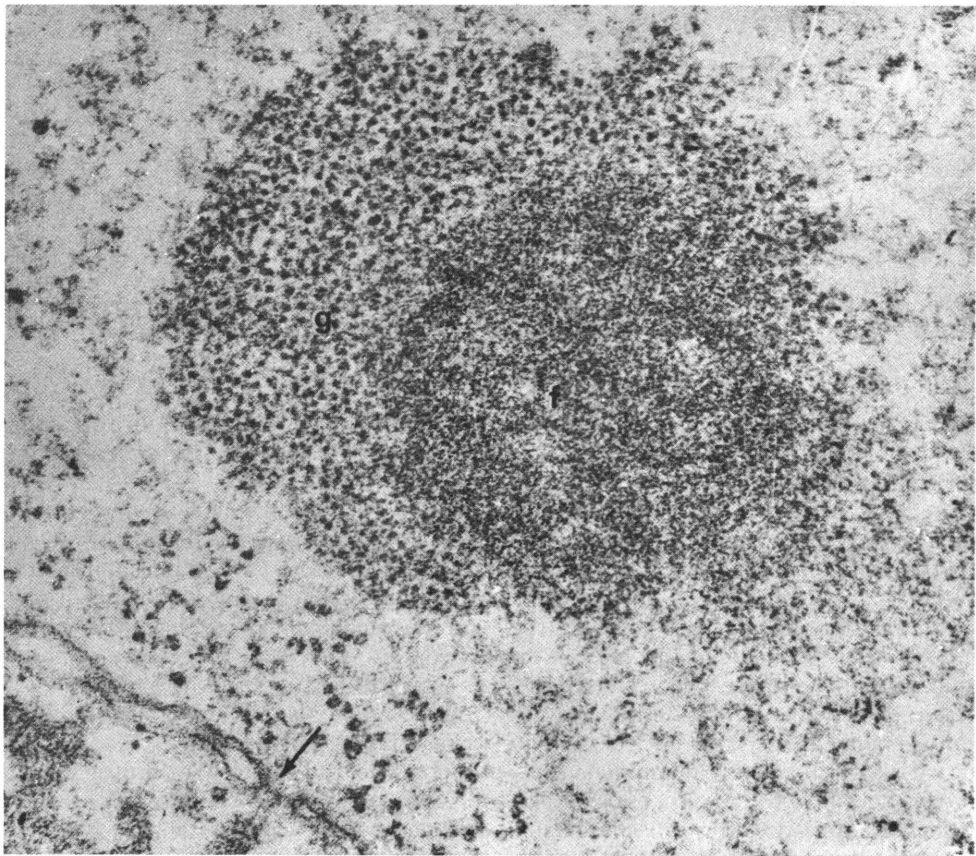


FIG. 12-23. Micrografía electrónica que muestra un nucleólo, con sus porciones fibrilar (f) y granular (g). Las flechas señalan materiales que salen al citoplasma a través de los poros nucleares. 70.000×. (Cortesía de O. L. Miller.)

La síntesis del ARNr 45S se realiza a una velocidad constante, lo cual indica que existe una regulación transcripcional poco significativa. En efecto, se comprobó que el número de ribosomas que la célula construye es regulado principalmente a través del control del procesamiento del ARNr 45S.

12-22. La síntesis y el procesamiento del ARNr 45S tienen lugar en el nucléolo

La síntesis y el procesamiento del ARNr 45S ocurren en el *nucléolo*, cuyo estudio ultramicroscópico muestra una estructura característica, con dos regiones perfectamente distinguibles (fig. 12-23):

1. Una región *fibrilar*, ubicada en el centro, donde se sintetiza el ARNr 45S y tienen lugar los primeros pasos de su procesamiento. Contiene los genes que codifican al ARNr 45S, moléculas de ARNr, factores de transcripción, la ARN polimerasa I, etc. A veces muestra pequeñas zonas más claras, aisladas, que corresponden a genes que no se están transcribiendo.

2. Una región *granular*, periférica, en la que se encuentran las distintas subunidades de los ribosomas en diversos estadios de procesamiento. El nucléolo no se halla envuelto por membrana alguna.

Las 200 copias del gen para el ARNr 45S están distribuidas en el ADN de las *constricciones secundarias* de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 (cap. 11-8) (figs. 10-12 y 10-14). Dado que los cromosomas existen de a pares, hay 10 de esas constricciones y se encuentra un promedio de 20 copias del gen en cada una. Los ADN en que se hallan esos genes emanan de las constricciones secundarias, como asas. En torno de ellas se construye el nucléolo, y cada asa —y por consiguiente el conjunto de genes que posee— constituye una unidad llamada *organizador nucleolar*.

El tamaño del nucléolo varía de acuerdo con la necesidad que tiene la célula de generar ribosomas.

Las diferencias las establece su región granular, que se expande o retrae según el ritmo con que se procesan las subunidades ribosómicas.

Cuando esas unidades han completado la mayor parte de su procesamiento, abandonan el nucléolo. Desde el núcleo pasan al citoplasma a través de los poros de la envoltura nuclear. Debido a que el diámetro de las subunidades ribosómicas supera al diámetro de los poros, debe producirse un leve cambio conformacional en una de las dos estructuras —o en ambas— para que el pasaje pueda realizarse sin obstáculos. El procesamiento se completa en el citoplasma, para evitar que las subunidades ribosómicas se ensamblen entre sí formando ribosomas en el interior del núcleo, con el consiguiente riesgo de que se sintetizen proteínas en su interior.

ARN RIBOSOMICO 5 S

12-23. El ARNr 5S se sintetiza fuera del nucléolo

Las aproximadamente 2.000 copias del gen que codifica al ARNr 5S se encuentran localizadas fuera del nucléolo (cap. 11-9). Su transcripción es dirigida por la *ARN polimerasa III*, que actúa una vez que tres factores de transcripción distintos, llamados TFIIA, TFIIB y TFIIC, se unen a la secuencia promotora del gen (fig. 12-24). El TFIIB se halla integrado por la subunidad TBP más varios TAFs. La síntesis del ARNr cesa cuando la ARN polimerasa III arriba a la secuencia de terminación, rica en timinas.

Apenas es sintetizado, el ARNr 5S debe ingresar en el nucléolo para asociarse a determinadas *proteínas ribosómicas* e incorporarse a la subunidad ribosómica mayor. No se sabe por qué este ARNr es sintetizado en un lugar distinto del de los restantes ARNr.

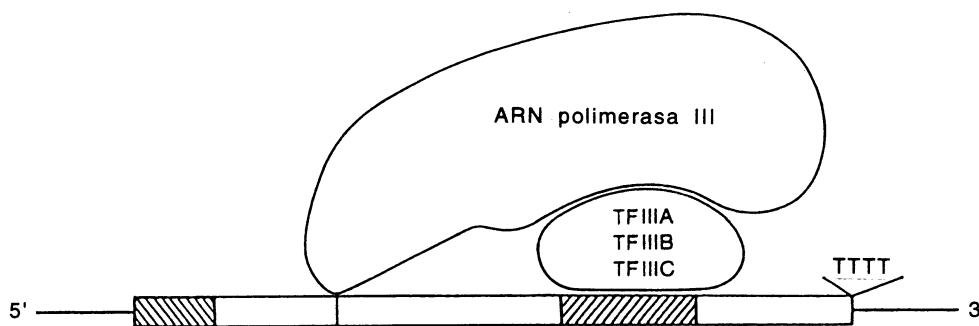


FIG. 12-24. Representación del gen del ARNr 5S, asociado a los factores de transcripción TFIIA, TFIIB y TFIIC y a la ARN polimerasa III.

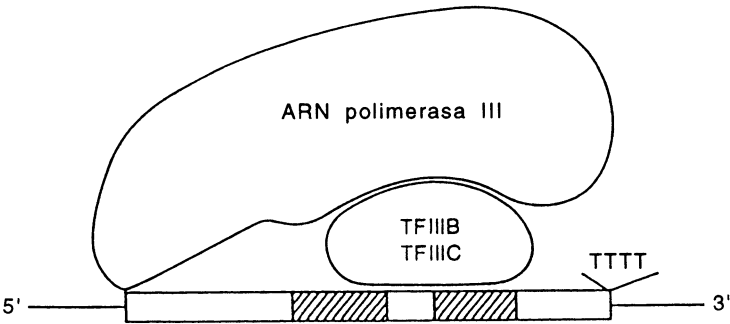


FIG. 12-25. Representación del gen de un ARNt, asociado a los factores de transcripción TFIIIB y TFIIIC y a la ARN polimerasa III.

ARN DE TRANSFERENCIA

12-24. Tras la síntesis de los ARNt, algunos de sus nucleótidos experimentan inusuales modificaciones

La transcripción de las 10 a 100 copias de cada uno de los genes que codifican a los distintos ARNt es dirigida también por la *ARN polimerasa III*, que requiere que se unan al promotor dos factores de transcripción, los recién nombrados TFIIIB (portador de la subunidad TBP) y TFIIIC (cap. 11-10) (fig. 12-25). Dada la presencia de varias timinas consecutivas en el extremo 3' del gen, la finalización de la síntesis de estos ARN es similar a la de los ARNr 45S y 5S.

Los ARNt contienen entre 73 y 93 nucleótidos. Su procesamiento incluye la remoción de un intrón, que se elimina por un mecanismo distinto del utilizado por los ARNm, pues prescinde del espliceosoma.

Algunos nucleótidos de los ARNt experimentan modificaciones inusuales en su composición, las cuales, debido a que impiden su apareamiento, favorecen el apareamiento de los otros nucleótidos entre sí, lo que da lugar a las singulares estructuras espaciales que caracterizan a esas moléculas, de cuyo análisis nos ocuparemos en el próximo capítulo (fig. 13-3). Por ejemplo, varias U son reducidas a dihidroxiuridinas (D), otras metiladas a ribotimidinas (T), otras transformadas en seudouridinas (Ψ), etc. (entre paréntesis aparecen los símbolos con los cuales se las identifica). La T, usada en los ARNt para simbolizar a las ribotimidinas, en el ADN, como se sabe, representa a las timinas, que no existen en el ARN.

El paso final del procesamiento de los ARNt consiste en el reemplazo de la secuencia AAA —que remata el extremo 3' de los transcritos primarios— por la secuencia CCA. En el capítulo 13-6 se valorará el significado de este cambio.

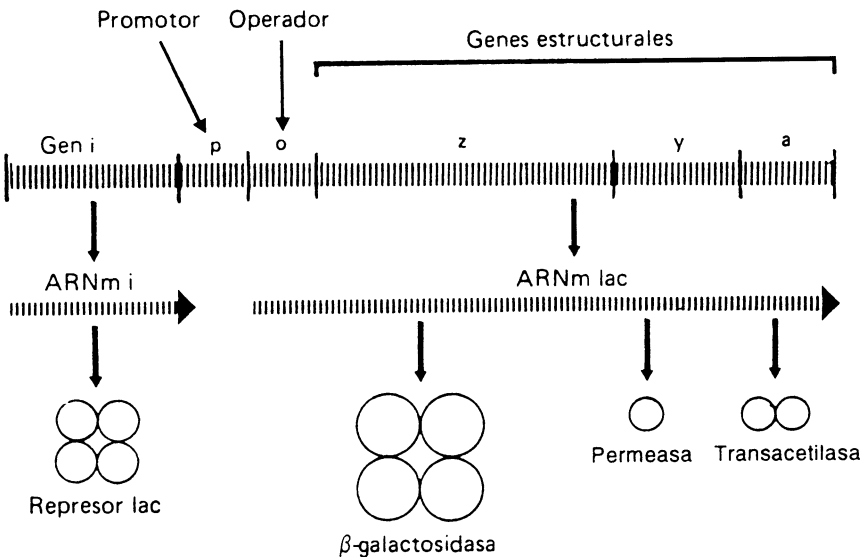


FIG. 12-26. Representación del operón lac, con el gen i, el promotor, el operador y los genes estructurales que codifican el ARNm policistrónico lac. Este da lugar a las proteínas β-galactosidasa, permeasa y transacetilasa.

REGULACION DE LA ACTIVIDAD GENETICA EN LAS CELULAS PROCARIOTAS

12-25. La regulación de la expresión de los genes bacterianos puede tener lugar en el comienzo o en la terminación de la transcripción

Las bacterias poseen miles de genes, entre los que se encuentran los que codifican a las proteínas enzimáticas, tanto las que participan en la degradación de los alimentos provenientes del medio como las que intervienen en la síntesis de las moléculas que componen el cuerpo bacteriano. La expresión de tales genes es controlada en algunos casos en el comienzo de la transcripción y en otros en el comienzo y en la terminación de ésta.

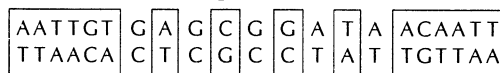
12-26. El operón lac es inducido por la lactosa

Puesto que las bacterias obtienen su alimento directamente del medio que las rodea, los mecanismos que regulan la actividad de sus genes deben adaptarse rápidamente a los cambios de calidad y cantidad de las moléculas (alimentos) en dicho medio. Un buen ejemplo de control transcripcional lo proporcionan los genes de las enzimas que intervienen cuando la bacteria *Escherichia coli* utiliza a la lactosa como alimento. La síntesis de estas enzimas puede aumentar hasta 1.000 veces si se agrega lactosa al medio de cultivo. Así, la disponibilidad de un sustrato estimula la producción de las enzimas que intervienen en su degradación. Esta regulación —por inducción enzimática— se da también para las enzimas que degradan a otros azúcares y a diversos aminoácidos y lípidos.

Las tres enzimas necesarias para la utilización de la lactosa como alimento son la β -galactosidasa, la permeasa y la transacetilasa, cuya codificación corresponde a una unidad genética común denominada operón lac (fig. 12-26). Un operón es un grupo de genes que se encuentran muy próximos entre sí y que pueden ser regulados (activados o inhibidos) en forma conjunta. El operón lac contiene tres genes estructurales, llamados *z*, *y* y *a* —que codifican a las tres enzimas mencionadas—, y dos elementos reguladores, el promotor (*p*) y el operador (*o*). Además, en la regulación de los genes bacterianos suele intervenir un gen represor (*i*). Los genes para las tres enzimas son transcritos en un solo ARNm (policistrónico), y esto explica por qué se expresan en cantidades equivalentes.

La expresión del operón lac es regulada por el represor lac, una proteína que posee cuatro subunidades idénticas de 40 kDa, codificadas por el gen *i* (fig. 12-27). El represor lac se une al operador,

que está situado cerca del comienzo del gen *z* (de la β -galactosidasa). Como se observa en la figura 12-27, la unión del represor lac al operador impide la síntesis del ARNm policistrónico. El represor lac se une a una secuencia de 21 pares de bases del operador, que es la siguiente:



Esta secuencia tiene regiones con simetría doble (en palíndromo), de modo que algunos sectores (en recuadros) ubicados en el lado izquierdo del operador se encuentran también en el lado derecho, pero en la cadena opuesta y dispuestos “en espejo”. Se han encontrado secuencias similares en los operadores de otros operones y en los reguladores de los genes en general (sección 12-11). Las secuencias simétricas representan sitios de reconocimiento para las distintas subunidades del represor.

12-27. El inductor se une al represor y lo desplaza del operador

La afinidad del represor con el operador está regulada por el inductor, que es una pequeña molécula que se liga al represor. El inductor natural del operón lac es la alolactosa, un metabolito de la lactosa —en las experiencias de laboratorio se usa el isopropiltiogalactósido (IPTG), que es un inductor más potente—. Cada subunidad del represor tiene un sitio de unión para el inductor; éste le provoca un cambio conformacional y entonces el represor abandona al operador. Como vemos, la presencia del inductor hace posible la transcripción del operón. El efecto de la presencia de lactosa —y, por lo tanto, de alolactosa— en el medio es espectacular. Mientras que en ausencia de lactosa la *Escherichia coli* contiene en promedio sólo tres moléculas de β -galactosidasa, después de la inducción del operón lac pasa a tener unas 3.000 moléculas de la enzima, las cuales representan el 3% de sus proteínas. Además esta adaptación es muy rápida, ya que la mayoría de los ARNm bacterianos, si bien se sintetizan a gran velocidad, tienen una vida media de unos pocos minutos. Como se sabe, el aumento o la disminución de la síntesis de los ARNm se refleja de inmediato en la síntesis de las proteínas.

12-28. La ARN polimerasa se une al promotor cuando el operador se libera del represor

El promotor es el segmento del gen donde se coloca la ARN polimerasa cuando se inicia la transcripción. En la figura 12-28 se muestra la secuencia de nucleótidos del promotor en el operón lac. Para la unión de la ARN polimerasa son importantes dos sectores: 1) la secuencia TATGTTG, situada entre 6

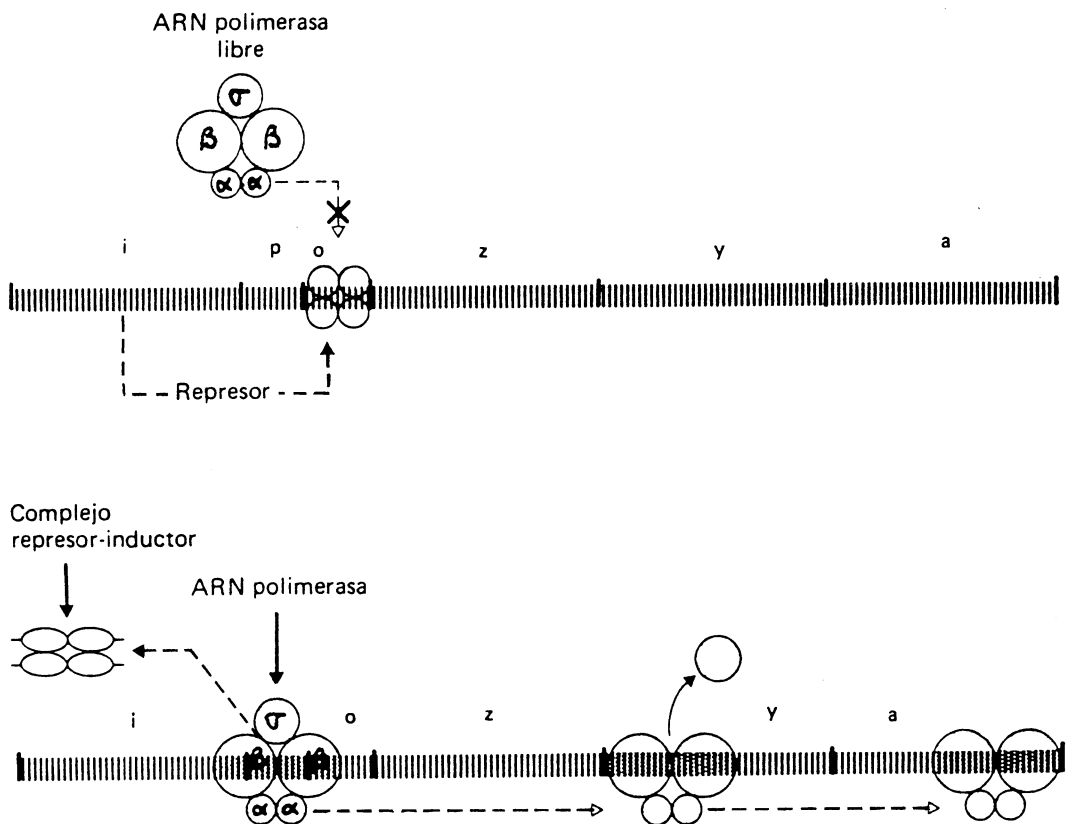


FIG. 12-27. Esquema que representa la regulación del operón lac en ausencia y en presencia de un inductor. En el primer caso, el represor lac se une al operador e interfiere la transcripción de los genes estructurales (el represor es un tetrámero con unidades de 40 kDa); los sitios de unión del represor y de la ARN polimerasa se superponen, de modo que la enzima es incapaz de unirse cuando el represor ocupa el operador. En el segundo caso, el inductor se une al represor y le produce un cambio de conformación que impide su unión con el operador; de esta manera la ARN polimerasa queda en libertad y puede transcribir a los genes estructurales. En la *Escherichia coli* la ARN polimerasa posee cinco subunidades de diferente tamaño: σ (95 kDa), β y β' (160 kDa cada una) y dos α (40 kDa). Adviértase que una vez iniciada la transcripción la subunidad σ se libera del complejo.

y 12 nucleótidos antes del sitio de comienzo de la transcripción, presente en casi todos los promotores, y 2) una secuencia localizada a 35 nucleótidos de ese sitio, importante porque si muta se inhibe la expresión del operón lac.

La ARN polimerasa se une a una región del gen de aproximadamente 80 nucleótidos, correspondiente al promotor. La presencia del represor en el operador bloquea la unión de la ARN polimerasa con el promotor. Así, los represores funcionan de

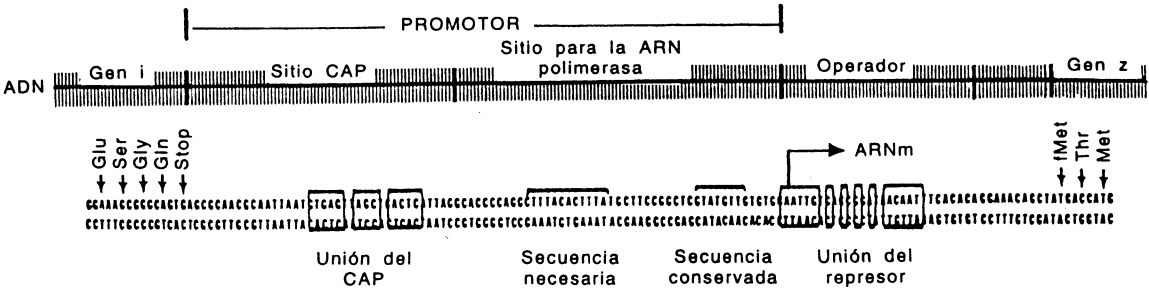


FIG. 12-28. Secuencia de nucleótidos del promotor y el operador del operón lac. En el promotor aparece la secuencia conservada TATGTTG y una secuencia necesaria, cuyas mutaciones afectan la transcripción del gen. (De R. C. Dickson y col., 1975.)

una manera muy simple: al estar unidos al operador impiden la fijación de la ARN polimerasa al promotor.

12-29. La transcripción del operón lac está sujeta a un control positivo por parte del AMP cíclico

El AMP cíclico (AMPc) participa en la regulación de la transcripción de los operones. Como veremos, su concentración en el protoplasma bacteriano es controlada indirectamente por la glucosa. La *Escherichia coli* posee una proteína receptora para el AMPc, llamada CAP (por "proteína activadora del gen del catabolito"). Se trata de una proteína dimérica, que se une al promotor del operón cuando se le asocia el AMPc. Ello hace que la ARN polimerasa también se una al promotor, en un sector cercano al que ocupa el complejo AMPc-CAP (fig. 12-28). Así, la ARN polimerasa reconoce al promotor siempre que el complejo AMPc-CAP se encuentre en él. Como vemos, en el operón lac, además del control negativo ejercido por el represor lac, se da un control positivo mediado por el complejo AMPc-CAP.

El control positivo se utiliza en la expresión de muchos otros operones, como los que intervienen en la utilización de la maltosa, la galactosa y la arabinosa. Sin embargo, este control no es necesario para la expresión de los genes que actúan durante la utilización de la glucosa como alimento. Ello es importante porque cuando las bacterias crecen en presencia de glucosa tienen menos moléculas

de AMPc que cuando lo hacen, por ejemplo, en un medio rico en lactosa, que como se sabe proporciona menos energía que la glucosa. En consecuencia, si la *Escherichia coli* se desarrolla en presencia de glucosa y lactosa, usará sólo la primera. Este mecanismo le permite a la *Escherichia coli* adaptarse a su cambiante hábitat natural, la luz intestinal.

12-30. En el operón Trp se regula la transcripción tanto en su comienzo como en su terminación

El operón triptófano codifica las cinco enzimas que se requieren para sintetizar el aminoácido (fig. 12-29). La expresión del operón Trp se regula por el nivel de triptófano en la célula, de modo que su presencia reprime la síntesis de las cinco enzimas. Este mecanismo regulador —por represión enzimática— también se observa en la síntesis de otros aminoácidos y en la de las moléculas precursoras de los ácidos nucleicos. En todos los casos la producción de las enzimas es inhibida por el producto final de la cadena metabólica. Por este mecanismo las bacterias tienen un recurso adicional para sintetizar enzimas sólo cuando las necesitan.

En la represión enzimática el gen *i* produce una proteína represora que normalmente es inactiva. Se activa cuando se le une un corepresor —en nuestro ejemplo, el aminoácido triptófano—, y en ese estado se liga al operador, que entonces bloquea la asociación de la ARN polimerasa con el promotor. Esto, como es obvio, detiene la actividad del operón.

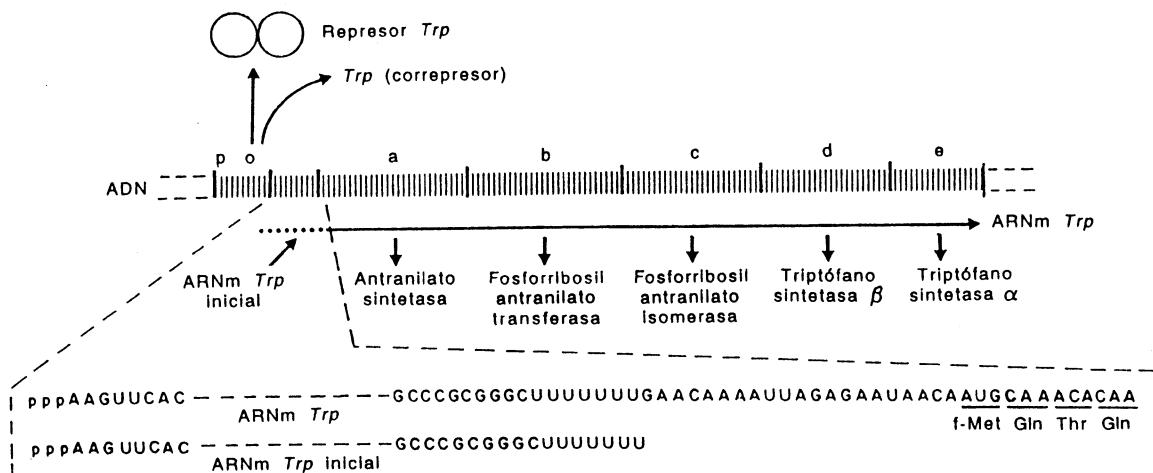


FIG. 12-29. El operón triptófano (*Trp*) de *Escherichia coli* es regulado tanto en el comienzo como en la terminación de la transcripción. En el primer caso actúa el represor *Trp*, y pueden producirse dos tipos de ARNm, uno corto (cuando abunda el *Trp*) y otro completo, que codifica las cinco enzimas surgidas del operón *Trp*. La proporción en que se forman ambos ARNm es regulada por la concentración del aminoácido *Trp* en la bacteria. El ARNm corto concluye con una serie de uracilos, cuya presencia es determinante en el control de la terminación de la transcripción, como puede apreciarse en la figura 12-30. (De K. Bertrand y col., 1975.)

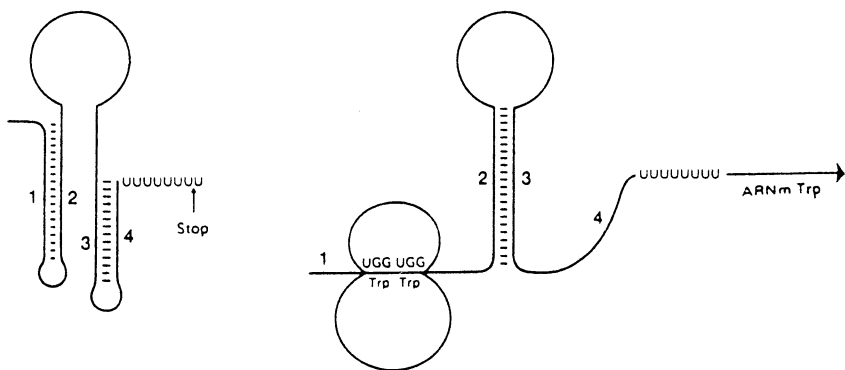


FIG. 12-30. Regulación del operón Trp de la *Escherichia coli* a nivel de la terminación de la transcripción. En presencia de triptófano se forma un asa (con los segmentos 3 y 4), que determina la conclusión de la transcripción. En ausencia de triptófano el ribosoma alcanza a dos codones de Trp consecutivos en el ARNm, lo que hace que el segmento 2 se aparee con el segmento 3. Este tipo de asa estimula el avance de la transcripción en toda su longitud, hasta completarse la formación del ARNm codificador de las cinco enzimas que se requieren para la síntesis del triptófano.

El operón Trp tiene un segundo mecanismo de regulación, que también depende de la cantidad de triptófano en la célula, pero que actúa a nivel de la terminación de la síntesis del ARNm policistrónico. En este como en otros operones, la terminación de la transcripción se produce prematuramente si los aminoácidos se encuentran en cantidades suficientes, y aumenta el número de moléculas de ARNm de longitud completa cuando esas cantidades decrecen. La terminación prematura de la transcripción coincide con el establecimiento de un *asa en horquilla* seguida por una sucesión de uracilos en el ARNm naciente (figs. 12-29 y 12-30). La carencia de triptófano lleva a la formación de otro tipo de asa, pero ésta no impide que se complete la transcripción.

12-31. En los procariotas también existe un control postranscripcional para regular la síntesis de moléculas

La inducción y la represión enzimáticas proporcionan un control general del metabolismo en los procariotas, activando o inhibiendo la síntesis de las enzimas de acuerdo con las necesidades (fig. 12-31). Sin embargo, este tipo de células posee mecanismos de regulación más finos, que controlan la actividad de las enzimas, no su síntesis. Los más comunes son: 1) la *inhibición por retroalimentación*, por la cual el producto final de un ciclo metabólico actúa como inhibidor alostérico de la primera enzima de la cadena, de modo que cuando se ha sintetizado una cantidad suficiente del pro-

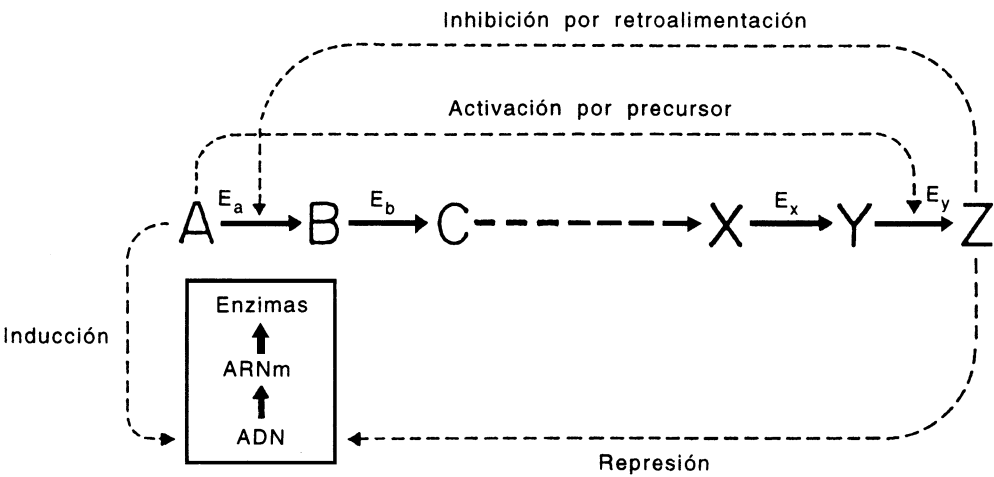


FIG. 12-31. En la inhibición por retroalimentación (*feedback*), el producto final Z de una cadena metabólica actúa como inhibidor alostérico de la primera enzima de la cadena. En la activación por precursor, el primer producto de la cadena (A) actúa como activador alostérico de la última enzima de la cadena.

ducto toda la cadena entra en reposo y se evita la acumulación inútil de metabolitos, y 2) la *activación por precursor*, en la cual el primer metabolito de la vía sintética actúa como activador alostérico de la última enzima de la cadena (fig. 12-31).

El control genético (por inducción o represión) es un tipo de regulación burdo y relativamente lento, mientras que la inhibición por retroalimentación y la activación por precursor son formas más finas y casi instantáneas de regulación. Por otra parte, el control genético economiza energía, ya que evita la síntesis de enzimas innecesarias; en cambio, el control de la actividad enzimática permite una adaptación casi instantánea del metabolismo celular.

BIBLIOGRAFIA

- Abelson J. (1979) RNA processing and the intervening sequence problem. *Annu. Rev. Biochem.* 48:1035.
- Adhya S. and Gargas S. (1982) How cyclic AMP and its receptor protein act in *E. coli*. *Cell* 29:287.
- Amara S. G., Jonas V., Rosenfeld M. G., Ong E. S. and Evans R. M. (1982) Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298:240.
- Aso T., Lane W. S., Conaway J. W. and Conaway R. C. (1995) Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science* 269:1439.
- Barlow D. P. (1993) Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation? *Science* 260:309.
- Beckwith J. and Zipser D. (1968) The Lactose Operon. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Bell S. P., Learned R. M., Jantzen H. M. and Tjian R. (1988) Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human rRNA synthesis. *Science* 241:1192.
- Beyer A. L., Bouton A. H. and Miller O. L. Jr. (1981) Correlation of hnRNP structure and nascent transcript cleavage. *Cell* 26:155.
- Bird A. (1992) The essentials of DNA methylation. *Cell* 70:5.
- Bird A. P. (1993) Genomic imprinting: imprints on islands. *Curr. Biol.* 3:275.
- Breithart R. E., Andreadis A. and Nadal-Ginard B. (1987) Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56:467.
- Brown D. D. (1981) Gene expression in eukaryotes. *Science* 211:667.
- Buratowski S. (1995) Mechanisms of gene activation. *Science* 270:1773.
- Busch H., Reddy R., Rothblum L. and Choi Y. C. (1982) snRNAs, snRNPs and RNA processing. *Annu. Rev. Biochem.* 51:617.
- Cech T. R. (1983) RNA splicing: three themes with variations. *Cell* 34:713.
- Cedar H. (1988) DNA methylation and gene activity. *Cell* 53:3.
- Chambon P. (1975) Eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 44:613.
- Comai L. et al. (1994) Reconstitution of transcription factor SL1: Exclusive binding of TBP by SL1 or TFIID subunits. *Science* 266:1966.
- Crick F. (1979) Split genes and RNA splicing. *Science* 204:264.
- Darnell J. E. Jr. (1982) Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* 297:365.
- Darnell J. E. Jr. (1983) The processing of RNA. *Sci. Am.* 249:90.
- Davidson E. H. and Britten R. J. (1973) Organization, transcription, and regulation in the animal genome. *Quart. Rev. Biol.* 18:565.
- Delihas N. and Anderson J. (1982) Generalized structures of the 5S ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res.* 10:7323.
- De Robertis E. M. (1983) Nucleocytoplasmic segregation of proteins and RNAs. *Cell* 32:1022.
- Doerfler W. (1983) DNA methylation in gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 52:93.
- Drapkin R., Merino A. and Reinberg D. (1993) Regulation of RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:469.
- Dynan W. S. and Tjian R. (1985) Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding protein. *Nature* 316:774.
- Engelke D. R., Shastri B. S. and Roeder R. G. (1980) Specific interaction of a purified transcription factor with and internal control region of 5S RNA genes. *Cell* 19:717.
- Galli G., Hoffsteter H. and Birnstiel M. L. (1981) Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature* 294:626.
- Galli D., Hoffsteter H., Stunnenberg H. G. and Birnstiel M. L. (1983) Biochemical complementation unit RNA in the *Xenopus* oocyte: a small RNA is required for the generation of 3' histone mRNA termini. *Cell* 34:823.
- Garrel J. and Campuzano S. (1991) The helix-loop-helix domain: a common motif for bristles, muscles and sex. *Bioassays* 13:493.
- Geiduschek E. P. (1988) Transcription by RNA polymerase III. *Annu. Rev. Biochem.* 57:873.
- Geiduschek E. P. and Kassavetis G. A. (1992) RNA polymerase III transcription complexes. In: *Transcriptional Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Gilbert W. (1976) Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. In: *RNA Polymerase*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Gilbert W. and Müller-Hill B. (1967) The lac operator is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58:2415.
- Green M. R. (1991) Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:559.
- Grunstein M. (1992) Histones as regulators of genes. *Sci. Am.* 267 (4):68.
- Guthrie C. and Patterson B. (1988) Spliceosomal snRNAs. *Annu. Rev. Genet.* 22:387.
- Hardin J. A., Rehn D., Shen C., Lerner M. R., Wolin S. and Steitz J. A. (1982) Antibodies from patients with connective tissue disease bind specific subsets of cellular RNA-protein particles. *J. Clin. Invest.* 70:141.
- Harland R. M., Weintraub H. and McKnight S. L. (1983) Transcription of DNA injected into *Xenopus* oocytes is influenced by template topology. *Nature* 302:38.
- Harrison S. C. (1991) A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 353:715.
- Harrison S. C. and Aggarwal A. K. (1990) DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu. Rev. Biochem.* 59:933.
- Heintz N., Sive H. L. and Roeder R. G. (1983) Regulation of histone gene expression. *Mol. Cell Biol.* 3:539.
- Heix J. and Grummt I. (1995) Species specificity of transcription by RNA polymerase I. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:652.
- Hentschel C. C. and Birnstiel M. L. (1981) The organization and expression of histone gene families. *Cell* 25:301.
- Hernández N. (1993) TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev.* 7:1291.
- Izaurrealde E. and Mattaj J. W. (1992) Transport of RNA between nucleus and cytoplasm. *Semin. Cell. Biol.* 3:279.
- Jackson M. E. (1991) Negative regulation of eukaryotic transcription. *J. Cell Sci.* 100:1.
- Jacob F. and Monod J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Molec. Biol.* 3:318.
- Kornberg R. D. and Lorch Y. (1992) Chromatin structure and transcription. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:563.

- Lamb P. and McKnight S. L. (1991) Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends Biochem. Sci.* 16:417.
- Landsschulz W. H., Johnson P. F. and McKnight S. L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759.
- Leff S. E., Rosenfeld M. G. and Evans R. M. (1986) Complex transcriptional units: diversity in gene expression by alternative RNA processing. *Annu. Rev. Biochem.* 55:1091.
- Lerner M. R., Boyle J. A., Mount S. M., Wolin S. L. and Steitz J. A. (1980) Are snRNP involved in splicing? *Nature* 283:220.
- Lerner M. R. and Steitz J. A. (1981) Snurps and scyrps. *Cell* 25:298.
- McDevitt M. A., Gilmartin G. M. and Nevins J. R. (1988) Multiple factors are required for poly(A) addition to a mRNA 3' end. *Genes & Devel.* 2:588.
- McKnight S. L. (1991) Molecular zippers in gene regulation. *Sci. Am.* 264 (4):54.
- McKnight S. L. and Kingsbury R. (1982) Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* 217:316.
- Maniatis T. and Ptashne M. (1976) A DNA operator-repressor system. *Sci. Am.* 234 (1):64.
- Martienssen R. A. and Richards E. J. (1995) DNA methylation in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:234.
- Meller J. H. and Reznikoff W. S. (1978) The Operon. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Miller O. L. Jr. (1981) The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. *J. Cell. Biol.* 91:155.
- Mitchell P. J. and Tjian R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA-binding proteins. *Science* 245:371.
- Nakajima N., Horikoshi M. and Roeder R. G. (1988) Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: functional analysis of initiation factors IIA and IID and identification of a new factor operating at sequences downstream of the initiation site. *J. Biol. Chem.* 263:3322.
- Nevins J. R. (1982) Adenovirus gene expression: control at multiple steps of mRNA biogenesis. *Cell* 28:1.
- Nevins J. R. and Chen-Kiang S. (1981) Processing of adenovirus nuclear RNA to mRNA. *Adv. Virus Res.* 26:1.
- Nishikura K. and De Robertis E. M. (1981) RNA processing in microinjected *Xenopus* oocytes: Sequential of base modifications in a spliced transfer RNA. *J. Mol. Biol.* 145:405.
- Pabo C. O. and Sauer R. T. (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61:1053.
- Padgett R. A., Konarska M., Grabowski P. J., Hardy S. F. and Sharp P. (1984) Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* 225:898.
- Padgett R. A. et al. (1986) Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 55:1119.
- Pastan I. and Perlman A. (1970) Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. *Science* 169:339.
- Proudfoot N. (1982) The end of the message. *Nature* 298:516.
- Reaney D. (1979) RNA splicing and polynucleotide evolution. *Nature* 277:598.
- Reeder R. H. (1992) Regulation of transcription by RNA polymerase I. In: *Transcriptional Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Rhodes D. and Klug A. (1993) Zinc fingers. *Sci. Am.* 268 (2):56.
- Rio D. C. (1992) RNA binding proteins, splice site selection, and alternative pre-mRNA splicing. *Gene Express.* 2:1.
- Roberts J. W. (1976) Transcription termination and its control in *E. coli*. In: *RNA Polymerase*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Robertson H. D. and Dickson E. (1974) RNA processing and the control of gene expression. *Brookhaven Symp. Biol.* 26:240.
- Roeder R. G. (1976) Eukaryotic nuclear RNA polymerases. In: *RNA Polymerase*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Roeder R. G. (1991) The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem. Sci.* 16:402.
- Ruskin B., Krainer A. R., Maniatis T. and Green M. R. (1984) Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 38:317.
- Sakonju S. and Brown D. D. (1982) Contact prints between a positive transcription factor and the *Xenopus* 5S RNA gene. *Cell* 31:395.
- Schleif R. (1992) DNA looping. *Annu. Rev. Biochem.* 61:199.
- Schmid C. W. and Jelinek W. R. (1982) The Alu family of dispersed repetitive sequences. *Science* 216:1065.
- Shaffer C. D., Wallrath L. L. and Elgin S. C. R. (1993) Regulating genes by packaging domains: bits of heterochromatin in euchromatin? *Trends Genet.* 9:35.
- Sharp P. A. (1981) Speculations on RNA splicing. *Cell* 23:643.
- Shatkin A. J. (1976) Capping of eukaryotic mRNAs. *Cell* 9:645.
- Skoglund U., Anderson K., Björkroth B., Lamb M. M. and Daneholt B. (1983) Visualization of the formation and transport of a specific hnRNP particle. *Cell* 34:847.
- Smith J. D. (1976) Transcription and processing of transfer RNA precursor. *Prog. Nucleic Acid Res.* 16:25.
- Steitz T. A. (1990) Structural studies of protein-nucleic acid interaction: the sources of sequence-specific binding. *Q. Rev. Biophys.* 23:205.
- Stroynowski I. and Yanofsky C. (1982) Transcript secondary structures regulate transcription termination at the attenuator of *S. marcescens* tryptophan operon. *Nature* 298:34.
- Struhl K. (1994) Duality of TBP, the universal transcription factor. *Science* 263:1103.
- Tjian R. (1995) Molecular machines that control genes. *Sci. Am.* 272 (2):38.
- Walter P. and Blobel G. (1982) Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 299:691.
- White R. J. and Jackson S. P. (1992) The TATA-binding protein: a central role in transcription by RNA polymerases I, II and III. *Trends Genet.* 8:284.
- Wise J. A. (1993) Guides to the heart of the spliceosome. *Science* 262:1978.
- Yanofsky C. (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289:751.

13 / Traducción del ARN mensajero

José Hib

13-1. Los ARNt desempeñan un papel crucial en la síntesis de las proteínas

Los ARNm son traducidos a proteínas por intermedio de distintos *ARN de transferencia* (ARNt), cada uno específico para uno de los 20 tipos de aminoácidos presentes en el citosol. El trabajo de los ARNt consiste en tomar del citosol a los aminoácidos correctos y conducirlos a las posiciones adecuadas, marcadas por los nucleótidos del ARNm, que son los moldes del sistema.

La síntesis proteica tiene lugar en el seno de los ribosomas, contruidos en el citosol a partir de subunidades ribonucleoproteicas provenientes del nucléolo. A semejanza de la síntesis de los ARN, la síntesis de las proteínas comienza con la unión entre sí de dos monómeros (aminoácidos), a partir de los cuales se forma una cadena que crece por el agregado de nuevos aminoácidos, uno por vez, en uno de los extremos de la cadena.

La clave de la traducción reside en el *código genético* compuesto por múltiples combinaciones de tres nucleótidos consecutivos (*tripletes*) en el ARNm, los cuales se relacionan específicamente con los 20 tipos de aminoácidos usados en la síntesis de las proteínas. Cada unidad de tres nucleótidos constituye un *codón*; existen en total 64 combinaciones, 61 de las cuales son utilizadas para cifrar aminoácidos y 3 para señalar el cese de la traducción. Tal cantidad deriva de una simple relación matemática: los cuatro tipos de nucleótidos (A, U, C y G) se combinan de a tres, por lo que se generan 4^3 (64) combinaciones posibles. El código genético, con los 64 trinucleótidos y los aminoácidos (o las señales de cese de la traducción) que especifican, puede consultarse en la figura 11-4.

Dado que existen más codones (61) que tipos de aminoácidos (20), casi todos son especificados por más de un codón, de modo que algunos triple-

tes se comportan como "*sinónimos*". Tales redundancias han hecho que se dijera que existe una "*degeneración*" del código genético. Solamente el triptófano y la metionina —los aminoácidos menos frecuentes en las proteínas— son codificados, cada uno, por un único codón.

Resta agregar que el número de codones en el ARNm determina la longitud de la proteína.

13-2. En el citosol existen 31 tipos diferentes de ARNt

Los intermediarios entre los codones del ARNm y los aminoácidos son los ARNt, cuyas moléculas tienen de un lado un dominio que se liga específicamente a uno de los 20 aminoácidos y del otro uno que lo hace, específicamente también, al codón adecuado. Este segundo dominio consta de una combinación de tres nucleótidos —llamada *anticodón*— complementaria de la del codón que codifica al aminoácido (fig. 13-3).

Cada tipo de ARNt lleva antepuesto el nombre del aminoácido que es capaz de transportar (por ejemplo, leucinil-ARNt para el aminoácido leucina, fenilalanil-ARNt para el de la fenilalanina, lisinil-ARNt para el de la lisina, metionil-ARNt para el de la metionina, etc.). Por su lado, el ARNt unido al aminoácido compatible con él se designa *aminoacil-ARNt*^{Ami}, en el que "Ami" corresponde a la sigla del aminoácido (por ejemplo, leucinil-ARNt^{Leu}, fenilalanil-ARNt^{Phe}, lisinil-ARNt^{Lys}, metionil-ARNt^{Met}, etc.).

Un razonamiento simple indicaría que deben existir 61 tipos de ARNt diferentes, pero eso no es cierto. Las células humanas poseen sólo 31, y el déficit es resuelto por la capacidad que tienen varios ARNt de reconocer a más de un codón. Lo consiguen gracias a que la primera base de los anticodones es por lo general *adaptable*, lo cual le permite establecer uniones inusuales con bases no

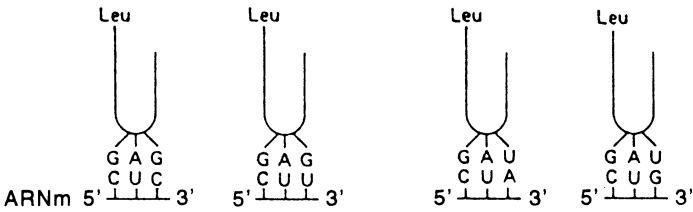


FIG. 13-1. Los dibujos ilustran cuatro de los seis codones que codifican al aminoácido leucina (Leu). Los dos de la izquierda se aparean con un mismo anticodón, igual que los dos de la derecha. Ello es posible porque la tercera base de los codones suele ser “adaptable”, es decir, puede establecer uniones con una base no complementaria.

complementarias situadas en la tercera posición del codón. Así, la G en la primera posición de un anticodón puede aparearse tanto con una C —es lo habitual— como con una U del codón (fig. 13-1). Inversamente, la U en la primera posición de un anticodón puede hacerlo con una A —es lo habitual— o con una G.

13-3. El codón de iniciación es el triplete AUG

El primer codón que se traduce en los ARNm es siempre un triplete *AUG*, cuya información codifica al aminoácido *metionina* (figs. 11-4 y 13-2). En consecuencia, este codón cumple dos funciones: señala el lugar de comienzo de la traducción, caso en el cual recibe el nombre de *codón de iniciación*, mientras en cualquier otra localización en el ARNm codifica a las metioninas ubicadas en medio de las moléculas proteicas.

El codón *AUG* de iniciación no sólo especifica el primer aminoácido de las proteínas (una metionina). También determina el “*encuadre*” de los sucesivos tripletes y, por tanto, la síntesis correcta de las proteínas. Tómese por ejemplo la secuencia AUGGCCUGUAACGGU. Si el ARNm es traducido a partir del codón *AUG*, los codones siguientes serán GCC, UGU, AAC y GGU, que codifican, respectivamente, a los aminoácidos alanina, cistina, asparagina y glicina. En cambio, si se omitiera la A del codón de iniciación, el encuadre de los tripletes sería el siguiente: UGG, CCU, GUA y ACG, los cuales traducen los aminoácidos triptófano, prolina, valina y treonina, respectivamente. Algo semejante ocurriría si también se omitiera la U, pues resultaría un tercer tipo de encuadre: GGC, CUG, UAA y CGG. En este caso, después de codificar los dos primeros codones a los aminoácidos glicina y leucina, la traducción se detendría, ya que UAA es un codón de terminación.

13-4. Los aminoácidos se ligan por medio de uniones peptídicas

La unión de los aminoácidos entre sí para construir una proteína se produce de modo que el grupo carboxilo (ácido) de un aminoácido se combina con el grupo amino (básico) del aminoácido siguiente, con pérdida de una molécula de H₂O (fig. 2-16). Esta combinación se conoce con el nombre de *unión peptídica*. La proteína mantiene el carácter anfotérico de los aminoácidos aislados, ya que le queda un grupo carboxilo libre en uno de sus extremos y uno amino en el otro extremo. La proteína es sintetizada a partir del extremo que lleva el grupo amino libre. Ello se corresponde con la dirección 5'→3' usada para la traducción del ARNm, la misma con que se define en el ADN la transcripción (fig. 13-9).

Antes de describir los procesos que dan lugar a la síntesis de las proteínas, analizaremos cómo arriban los ARNm al citoplasma, qué configuración poseen los ARNt y cuál es la estructura de los ribosomas.

13-5. El arribo de los ARNm al citoplasma involucra procesos relativamente complejos

Como vimos en el capítulo 12-6, en el núcleo los transcritos primarios precursores de los ARNm se hallan asociados a diversas proteínas, con las cuales forman las llamadas ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (RNPhn). Muchas de esas proteínas —entre las que se encuentran las de los espliceosomas— se desprenden de los ARNm a medida que éstos se procesan, y quedan libres apenas los ARNm se disponen a salir hacia el citoplasma por los poros de la envoltura nuclear. Arribados al citoplasma, los ARNm se combinan con otras proteínas y con los ribosomas, para comenzar

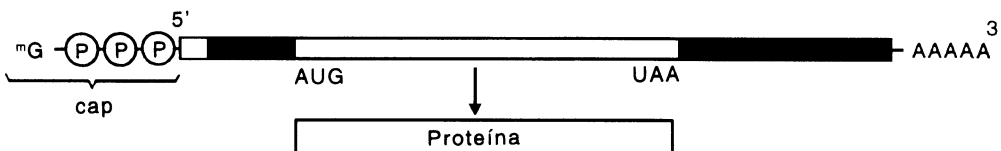


FIG. 13-2. Esquema de un ARN mensajero con sus distintos componentes.

a asumir sus funciones en la síntesis proteica. Entre las proteínas se encuentran las llamadas *CBP* (por *cap binding proteins*), que se ligan al cap en el extremo 5' del ARNm. Se cree que intervienen en los desplazamientos del ARNm una vez que abandona el núcleo.

Algunos ARNm se ubican en lugares prefijados del citoplasma, de modo que las proteínas que codifican tengan que ser sintetizadas en esos sitios. Tal es el caso del ARNm de la actina, que se desplaza hasta la periferia de la célula, donde la actina se sintetiza y se deposita en su mayor parte.

El extremo 5' de los ARNm contiene una secuencia de alrededor de 10 nucleótidos previa al codón de iniciación —entre éste y el cap—, que obviamente no se traduce. En algunos ARNm esta secuencia participa en el control de la traducción y en otros regula la estabilidad del ARNm, es decir, su supervivencia. Otro tipo de secuencia, de hasta miles de nucleótidos, suele hallarse después del codón de terminación, entre éste y la poli A. Tiene por función controlar la supervivencia del ARNm (fig. 13-2).

13-6. Las moléculas de los ARNt adquieren una forma característica

Hemos visto que los codones del ARNm no seleccionan a los aminoácidos directamente y que la traducción de los ARNm en proteínas depende de una serie de moléculas intermediarias —los ARNt— que actúan como adaptadores, ya que discriminan simultáneamente a los codones del ARNm y a los aminoácidos compatibles con ellos, de modo que éstos puedan alinearse de acuerdo con el ordenamiento de esos codones.

Para cumplir con sus funciones, los ARNt adquieren una forma característica, que se asemeja a un *trébol* de cuatro hojas (fig. 13-3). Los cuatro brazos se generan por la presencia en los ARNt de secuencias de 3 a 5 pares de nucleótidos complementarios, apareados de manera similar a la observada en la doble hélice del ADN. En la punta de uno de los brazos confluyen los extremos 5' y 3' del ARNt. El extremo 3' sobresale, de modo que queda expuesto su *trinucleótido* CCA, incorporado durante el procesamiento del ARNt en el núcleo

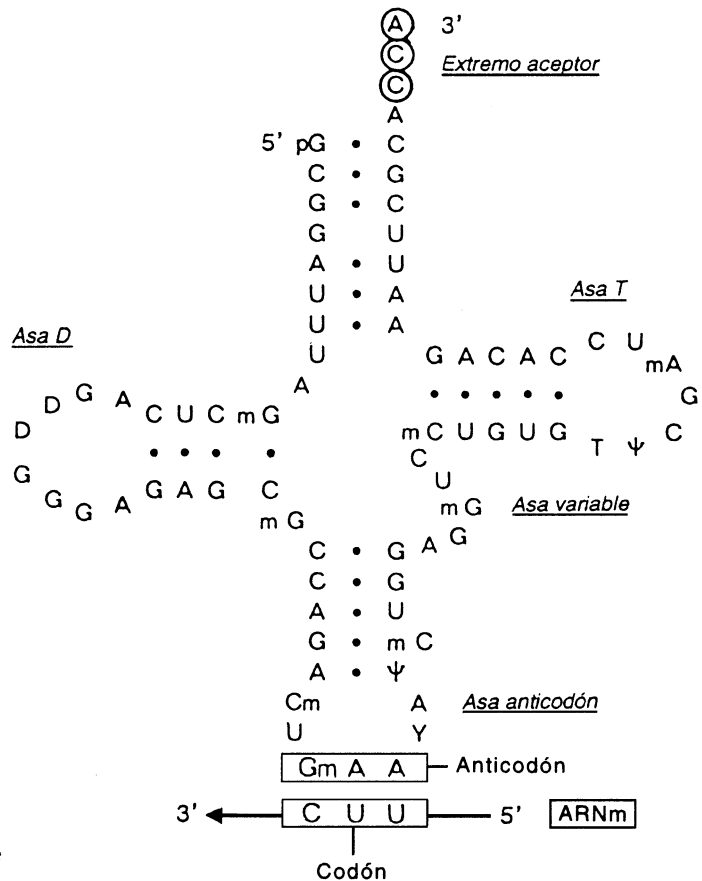


FIG. 13-3. Modelo en hoja de trébol de los ARN de transferencia.

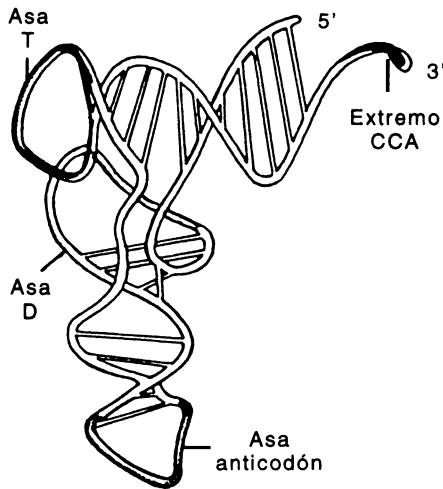


FIG. 13-4. Estructura terciaria de los ARN de transferencia, que muestra una configuración en L. Se indican las regiones ilustradas en la figura 13-2. (De A. Rich, 1978.)

(cap. 12-24). El brazo que estamos analizando recibe el nombre de *aceptador*, debido a que el aminoácido se liga a la adenina del trinucleótido CCA.

Los tres brazos restantes poseen en sus extremos libres secuencias de 7 a 8 nucleótidos no apareados, con forma de asas, cuyas denominaciones derivan de los nucleótidos que las caracterizan. Una de ellas, por contener dihidroxiuridinas (D), se denomina *asa D*. Otra contiene el triplete de nucleótidos del *anticodón*, de manera que su composición varía en cada tipo de ARNt según el aminoácido que transporta. La tercera se conoce como *asa T*, debido a la secuencia TΨC que la identifica. Vimos en el capítulo 12-24 que la letra T simboliza a la ribotimidina y la Ψ a la pseudouridina. Entre los dos últimos brazos nombrados suele hallarse una asa adicional, llamada *variable* porque su longitud difiere bastante en los distintos ARNt.

Un plegamiento ulterior le da a los ARNt una configuración tridimensional distinta, de modo que la hoja de trébol se convierte en una estructura con *aspecto de L* (fig. 13-4). El cambio se debe al establecimiento de formas inusuales de apareamiento entre ciertos nucleótidos, algunos de los cuales se combinan con dos nucleótidos a la vez. Formada la L, en una de sus puntas se localiza el brazo aceptador y en la otra punta el triplete de bases del anticodón. Las asas T y D quedan ubicadas en el punto de encuentro de los dos brazos de la L.

El aminoácido se liga a su ARNt específico por la acción de una enzima llamada *aminoacil-ARNt sintetasa*, que cataliza la unión en dos pasos. Durante el primero, el aminoácido se liga a un AMP, con el cual forma un aminoacil-AMP (por ejemplo, leucinil-AMP, fenilalanil-AMP, lisinil-AMP, metionil-

AMP, etc.). Dado que el AMP deriva de la hidrólisis de un ATP, se libera un pirofosfato (PPi) y energía, que también pasa al aminoacil-AMP. En el segundo paso esa energía es utilizada por la aminoacil-ARNt sintetasa para transferir el aminoácido del aminoacil-AMP a la A del trinucleótido CCA del ARNt compatible y formar así una molécula crucial para la síntesis proteica: el aminoacil-ARNt^{Ami} capaz de reconocer el codón complementario en el ARNm.

13-7. Existen 20 aminoacil-ARNt sintetasas diferentes

Existen 20 aminoacil-ARNt sintetasas diferentes, cada una diseñada para reconocer un tipo de aminoácido y a la vez el ARNt compatible con él. Cada aminoacil-ARNt sintetasa puede identificar al ARNt correcto —y unir el aminoácido a su brazo CCA— por señales emanadas del anticodón, la parte más específica del ARNt (fig. 13-3). No obstante, en la mayoría de los ARNt existen otras señales que son reconocidas por la enzima, en general ciertas combinaciones de nucleótidos cercanas al anticodón.

Esta es la causa por la cual cada uno de los 31 tipos de ARNt transporta sólo uno de los 20 tipos de aminoácidos usados en la síntesis proteica. La existencia de 11 clases de ARNt en exceso hace que algunos aminoácidos puedan ser reconocidos por más de un ARNt.

Uno de estos ARNt redundantes es especial; se llama *ARNt iniciador* o *ARNt(i)*, pues transporta a la metionina destinada exclusivamente al codón AUG de iniciación (fig. 13-9). Es muy probable que en el contexto de este codón exista alguna señal que diferencie al metionil-ARNt(i)^{Met} —portador de la metionina dirigida a él— de los metionil-ARNt^{Met} comunes, portadores de las metioninas destinadas a los restantes codones AUG.

13-8. Los ribosomas están compuestos por dos subunidades ribonucleoproteicas

Los mecanismos necesarios para ordenar a los ARNt a lo largo del ARNm son algo complicados. Requieren de los *ribosomas*, cuya primera tarea es localizar el codón de iniciación en el extremo 5' del ARNm y acomodarlo de modo tal que el "enquadre" para la lectura de los siguientes tripletes sea el adecuado. Luego el ribosoma se desliza hacia el extremo 3' del ARNm, traduciendo esos tripletes en aminoácidos, los cuales —uno por vez— son traídos por los respectivos ARNt. Las reacciones que ligan a los aminoácidos entre sí (uniones peptídicas) tienen lugar también en el ribosoma. Cuando el ribosoma arriba al *codón de terminación* (en el extremo 3' del ARNm) cesa la síntesis proteica y la proteína es liberada. Como puede apreciarse, en

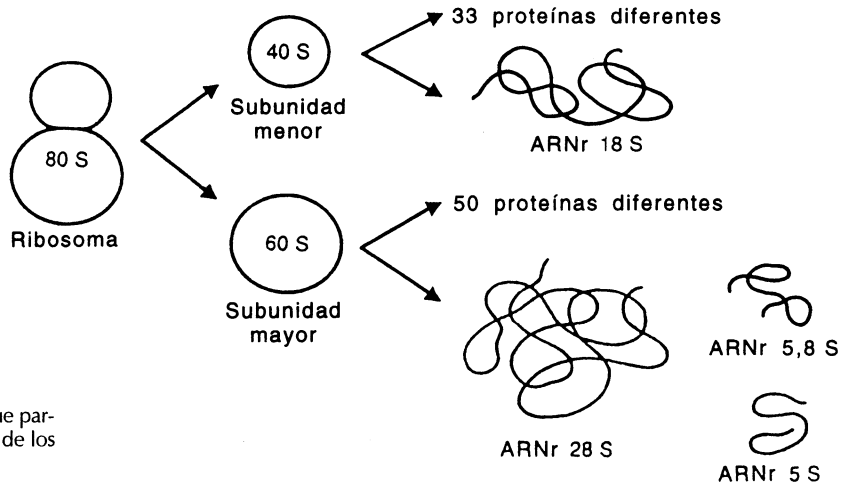


FIG. 13-5. Moléculas que participan en la formación de los ribosomas citosólicos.

las células los ribosomas constituyen las “fábricas” de las proteínas.

Cada ribosoma está compuesto por *dos subunidades*, identificadas con las siglas 40S y 60S (fig. 13-5). Estos números hacen referencia a sus coeficientes de sedimentación, es decir, a las velocidades con que las subunidades sedimentan al ser ultracentrifugadas (la subunidad 60S, por la acción de la fuerza centrífuga, migra más rápidamente hacia el fondo del tubo). Las subunidades 40S y 60S juntas forman la unidad 80S, es decir, un ribosoma completo (los números no se adicionan porque los coeficientes de sedimentación no equivalen a los pesos de las moléculas).

Cada subunidad ribosómica se halla integrada por una o más moléculas de ARNr, más un determinado número de *proteínas*. Así, la subunidad 40S contiene el ARNr 18S más 33 proteínas, mientras que la subunidad 60S se integra con los ARNr 28S, 5,8S y 5S más 50 proteínas (fig. 13-5). Dado que las 83 proteínas ribosómicas son construidas a partir de sus respectivos ARNm, puede decirse que en la formación del ribosoma intervienen 85 genes (83 corresponden a las proteínas, uno al ARNr 45S y otro al ARNr 5S).

13-9. El ensamblaje de los ARNr con las proteínas ribosómicas se produce en el nucléolo

En el capítulo 12-22 vimos que el ensamblaje de las proteínas ribosómicas con los ARNr tiene lugar en el *nucléolo*, de modo que esas proteínas —sintetizadas en los ribosomas citosólicos— deben primero ingresar en el núcleo y luego, como integrantes de las subunidades ribosómicas, volver al citoplasma.

Las proteínas de la subunidad menor se denominan S1, S2, ..., S33 (S por *small*), y las de la subunidad mayor, L1, L2, ..., L50 (L por *large*).

Cada ARNr exhibe varias asas a lo largo de su molécula debido al apareamiento de determinadas secuencias complementarias de nucleótidos, existentes en la propia molécula. Por consiguiente, en algunos tramos de los ARNr se forman dobles hélices semejantes a las del ADN (fig. 13-6). Estos apareamientos tienen por función establecer la configuración tridimensional de los ARNr, al permitir que sus partes puedan combinarse adecuadamente con las proteínas ribosómicas.

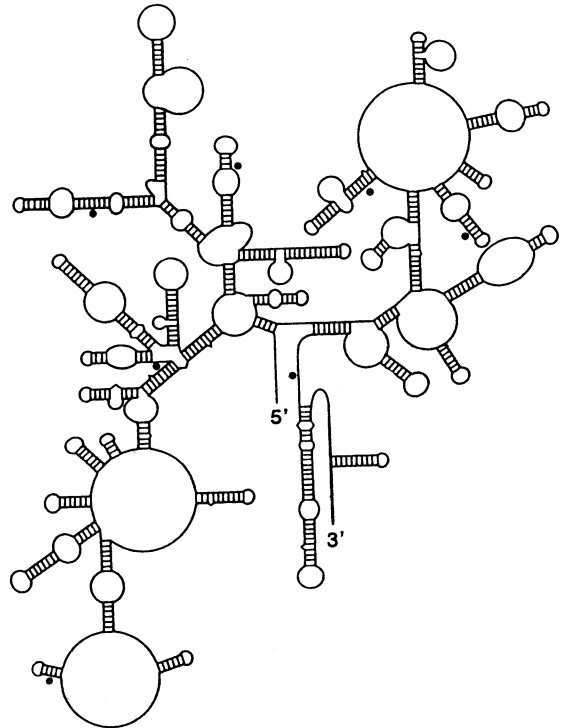


FIG. 13-6. Forma como se autoaparean los tramos complementarios de los ARNr ribosómicos.

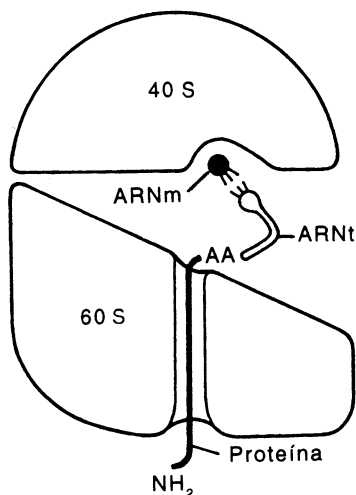


FIG. 13-7. Esquema de un ribosoma que muestra sus dos subunidades y la posible ubicación del ARNm (cortado transversalmente) y de los ARNt ligados a los respectivos aminoácidos. La cadena polipeptídica pasaría a través de un túnel localizado en la subunidad mayor. (Cortesía de D. D. Sabatini y G. Blobel.)

En la subunidad 40S la disposición de algunas proteínas da lugar a la formación de dos áreas especiales —una al lado de la otra—, denominadas *sitio P* (por “*peptidil*”) y *sitio A* (por “*aminoacil*”), cuyas funciones analizaremos en breve (fig. 13-9). Además, en la subunidad mayor se formaría un “túnel” por el cual saldría la cadena polipeptídica a medida que se sintetiza (fig. 13-7).

Las unidades ribosómicas se reparten el trabajo llevado a cabo por los ribosomas. Así, la *subunidad menor* coloca a dos ARNt consecutivos cerca del ARNm para su mutua ligazón, mientras que la *subunidad mayor* cataliza las uniones peptídicas y asiste a los factores que actúan en los distintos pasos de la síntesis proteica (los cuales serán descritos pormenorizadamente en seguida). Es posible que la función catalítica de la subunidad mayor esté en manos de algunos de sus ARNr y no de sus proteínas (cap. 12-17).

13-10. Los polirribosomas se forman al asociarse una molécula de ARNm con muchos ribosomas

Cada ARNm suele traducirse no por uno sino por varios ribosomas a la vez, los cuales se deslizan por su molécula siguiendo la dirección 5'→3', en fila india, separados unos de otros por una distancia de alrededor de 30 codones. Tales asociaciones, que son claramente detectables en las imágenes ultramicroscópicas, se denominan *polirribosomas* (fig. 13-8).

Los ribosomas pueden encontrarse *libres* en el citosol o *asociados* a las membranas del retículo endoplasmático. En el primer caso elaboran proteínas destinadas al núcleo (por ejemplo, histonas, proteínas ribosómicas, factores de transcripción, etc.), a las mitocondrias, a los peroxisomas o al propio citosol. En el segundo caso, las proteínas son volcadas en el interior del retículo endoplasmático o retenidas en su membrana, y pueden permanecer en este organelo o ser transportadas —por medio de vesículas de transporte— al complejo de Golgi, desde donde pasarán a los lisosomas, a la membrana plasmática o bien serán secretadas al exterior.

ETAPAS DE LA SINTESIS PROTEICA

13-11. En la síntesis proteica se distinguen tres etapas

La síntesis de las proteínas puede dividirse en *tres etapas*, llamadas de iniciación, de elongación y de terminación (fig. 13-9).

La *etapa de iniciación* es regulada por la presencia de ciertas proteínas denominadas *factores de iniciación* (IF), que dan lugar a dos hechos separados pero concurrentes, uno en el extremo 5' del ARNm y otro a nivel de la subunidad menor del ribosoma. El primero involucra al cap y a una secuencia de nucleótidos aledaña, localizada entre el cap y el codón de iniciación (sección 13-5). Estas estructuras son reconocidas por el factor IF4, con el cual se ligan. En el segundo, el *metionil-ARNt(i)^{Met}* —junto a un GTP— se une a la subunidad menor del ribosoma, participando en esta reacción el factor IF2.

Logrados ambos acondicionamientos, interviene el factor IF3, que adosa el extremo 5' del ARNm a una de las caras de la subunidad menor del ribosoma. Esta subunidad, tras deslizarse por el ARNm unos cuantos nucleótidos, ayuda al anticodón UAC del *metionil-ARNt(i)^{Met}* a localizar el *codón AUG de iniciación*. El *metionil-ARNt(i)^{Met}* se detiene luego de producirse un correcto encuadre entre los tripletes complementarios del codón y el anticodón. Como consecuencia, el codón de iniciación queda acomodado en el *sitio P* de la subunidad menor y el segundo codón del ARNm queda invariablemente ubicado en el *sitio A* de dicha subunidad, al lado del *sitio P*.

La etapa de iniciación culmina al combinarse la *subunidad mayor* del ribosoma con la menor para formar un ribosoma completo. Entre las citadas subunidades quedan encerrados los dos primeros codones del ARNm, el AUG de iniciación —unido al *metionil-ARNt(i)^{Met}*— en el *sitio P* y el segundo codón en el *sitio A*.

13-12. En el alargamiento de la cadena peptídica intervienen factores de elongación

La etapa de elongación comienza al acercarse otro aminoacil-ARNt^{Ami} —éste compatible con el segundo codón del ARNm, con el cual se une— al sitio A. Al quedar ambos aminoacil-ARNt^{Ami} cerca, el aminoácido situado en el sitio P (una metionina), al tiempo que se desacopla del metionil-ARNt(i), se liga mediante una unión peptídica al aminoácido ubicado en el sitio A. Se forma de este modo un dipeptidil-ARNt, que permanece ubicado en el sitio A. Su permanencia en ese sitio es breve (en seguida veremos hasta cuándo).

Entre tanto, fuera del ribosoma, esperando para ingresar, se encuentra el tercer codón del ARNm, al que se le ligará el correspondiente aminoacil-ARNt^{Ami}. Esta reacción es mediada por un factor de elongación —llamado EF1 α — y consume energía, que es aportada por una molécula de GTP. De inmediato el ARNm se desplaza en dirección de su extremo 5', por un proceso llamado *translocación*. Lo hace mediante el factor de elongación EF2, que consume la energía aportada por otro GTP. El corrimiento del ARNm hace que el codón de iniciación sea desalojado del sitio P —y por consiguiente del ribosoma—, el segundo codón se mude del sitio A al sitio P y el tercer codón ingrese al sitio A vacante. Lógicamente, el corrimiento de los codones desplaza también a los respectivos ARNt, por lo que el ARNt(i) sale del ribosoma —no tarda en desprenderse del codón de iniciación—, el dipeptidil-ARNt pasa al sitio P y el tercer aminoacil-ARNt^{Ami} se acomoda en el sitio A.

El paso siguiente comprende la formación de una nueva unión peptídica, esta vez entre el dipeptido —previo desacoplamiento del dipeptidil-ARNt— y el aminoácido del tercer aminoacil-ARNt^{Ami}. Tal unión da lugar a un tripeptidil-ARNt,

que permanece en el sitio P hasta la próxima translocación del ARNm. Los procesos arriba citados se repiten en forma consecutiva codón tras codón, formándose en el cuarto paso un tetrapeptidil-ARNt y luego peptidil-ARNt cada vez más largos, que se translocan del sitio A al P conforme se suceden las uniones peptídicas. Se calcula que en promedio se agregan a la cadena peptídica unos 5 aminoácidos por segundo.

Debido a que con cada translocación se corren tres nucleótidos del ARNm, el extremo 5' de éste se aleja progresivamente del ribosoma y su extremo 3' se acerca a él en igual medida. Cuando el extremo 5' del ARNm se ha alejado unos 90 nucleótidos del ribosoma, en torno del codón de iniciación se establece un nuevo ribosoma, y con él el inicio de la síntesis de una nueva cadena proteica. Esto se repite una y otra vez, de modo tal que cuando el primer ribosoma formado se halla en las cercanías del extremo 3' del ARNm, toda la molécula del ARNm, cada 90 nucleótidos (30 codones), se encuentra asociada con ribosomas. Este complejo, cuyo largo depende de la longitud del ARNm, recibe —como vimos— el nombre de *polirribosoma* (fig. 13-8).

13-13. La síntesis proteica culmina cuando el ribosoma es alcanzado por el codón de terminación

La síntesis de la proteína culmina cuando el ribosoma es alcanzado por el *codón de terminación del ARNm* (UAA, UGA o UAG, indistintamente), lo cual deja al sitio A vacío —sin el esperado aminoacil-ARNt^{Ami}—, aunque pronto es ocupado por un factor de terminación (TF). Ante la ausencia del aminoacil-ARNt^{Ami}, el polipéptido del peptidil-ARNt —situado en el sitio P— se desliga del ARNt y se une, para formar su carboxilo libre, a una molécula

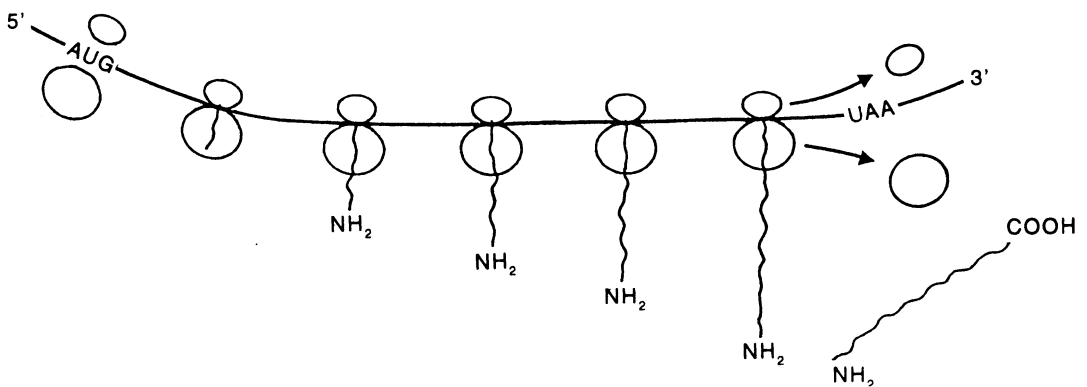
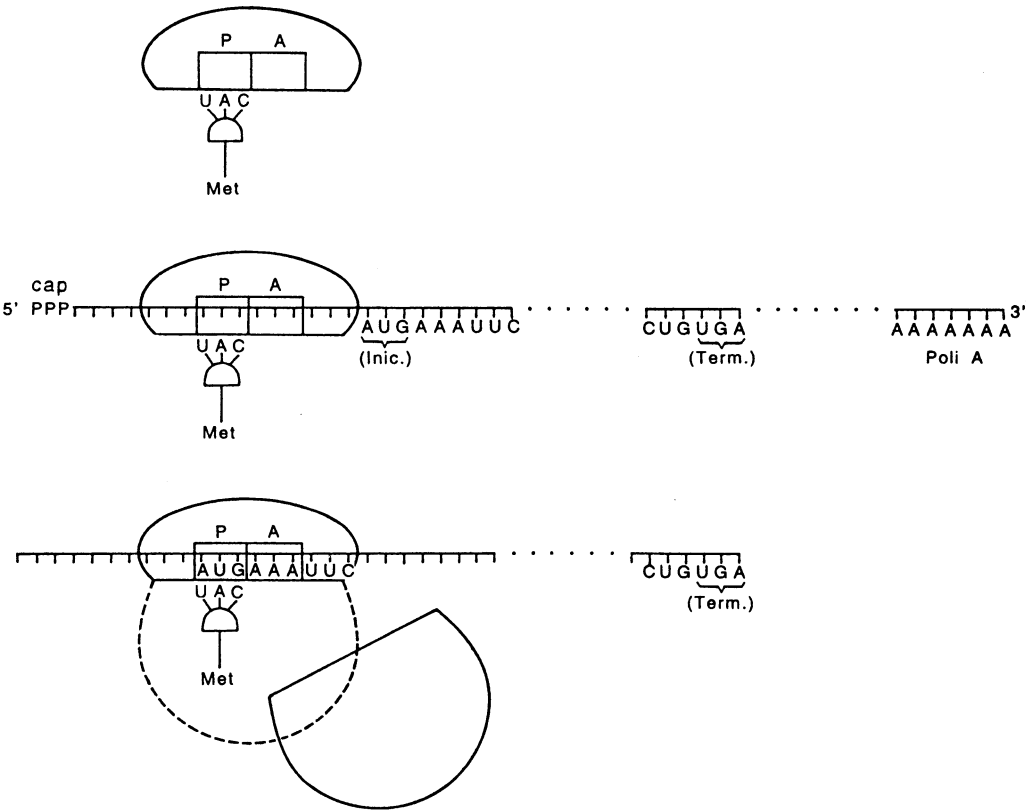
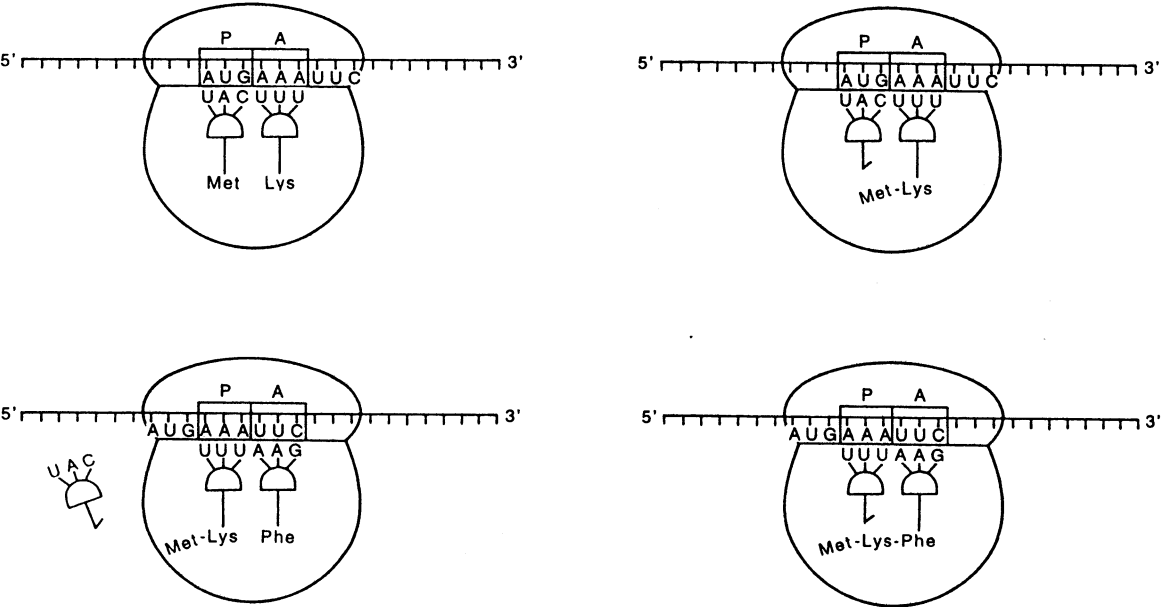


FIG. 13-8. Formación de un polirribosoma por la asociación simultánea de varios ribosomas a un mismo ARNm.

INICIACION



ELONGACION



de H_2O . Ello hace que el polipéptido —la proteína— se independice del ARNm y entonces se libera del ribosoma. Las subunidades 40S y 60S de éste se separan y pasan al citosol, donde integran un fondo común que abastece de subunidades ribosómicas al sistema para continuar formando ribosomas —y con ello nuevas cadenas proteicas— en el extremo 5' del mismo ARNm o de otro que se esté traduciendo (fig. 13-8).

Como vemos, el número de ribosomas en el polirribosoma, es decir, el número de lugares en los que tiene lugar la síntesis proteica, se mantiene relativamente constante, ya que a medida que unos ribosomas se retiran del extremo 3' del ARNm, otros se ensamblan en su extremo 5' (fig. 13-8).

Esta síntesis continuada de una proteína a partir de un mismo ARNm —por el trabajo simultáneo de varios ribosomas— es interrumpida, en el momento que corresponde, por la acción de factores reguladores, como veremos más adelante.

13-14. La metionina situada en el extremo 5' de la proteína suele ser removida

Varias veces hemos dicho que la traducción del ARNm se produce en dirección $5' \rightarrow 3'$ y que el aminoácido determinado por el codón de iniciación, en el extremo 5' del ARNm, es una metionina, portadora, como es lógico, del grupo amino libre de la cadena proteica en formación. Esta metionina usualmente es removida, por lo que el segundo aminoácido pasa a la primera posición. En el extremo opuesto de la proteína se encuentra el aminoácido que lleva el grupo carboxilo libre de la cadena proteica, determinado por el triplete previo al codón de terminación, en el extremo 3' del ARNm. Surge de estos datos que en las uniones peptídicas que tienen lugar en el ribosoma, el gru-

po carboxilo es cedido por la cadena peptídica en crecimiento (ubicada en el sitio P) y el grupo amino por el aminoácido del aminoacil-ARNt (ingresado al sitio A).

Las uniones peptídicas, así como las restantes reacciones químicas producidas durante las tres etapas de la síntesis proteica, son catalizadas por la actividad enzimática de algunos componentes de la *subunidad ribosómica mayor*, estimándose que son los propios ARNr, y no proteínas ribosómicas, los que ejercen esa actividad.

13-15. Las proteínas emanadas de los ribosomas portan señales en sus moléculas que las conducen al destino adecuado

Teóricamente, una célula posee los recursos necesarios para sintetizar unas 10.000 proteínas distintas. Emanadas de los ribosomas, tales proteínas pueden permanecer en el citosol o tener como destino el núcleo, las mitocondrias, los peroxisomas o el retículo endoplasmático. Por ejemplo, las histonas y otras proteínas nucleares deben cruzar los poros nucleares para ingresar en el núcleo; las enzimas del ciclo de Krebs deben atravesar las dos membranas de la mitocondria para llegar a la matriz mitocondrial; la catalasa debe pasar a través de la membrana del peroxisoma para arribar a su matriz; etc. Respecto de las proteínas destinadas al retículo endoplasmático, para que puedan ser colocadas en la membrana o en el interior del orgánulo los ribosomas deben establecer una íntima relación con él, lo que da lugar al retículo endoplasmático rugoso.

Un tráfico tan selectivo obliga a las proteínas surgidas de los ribosomas —excepto las que permanecerán en el citosol— a portar alguna señal que las conduzca a los orgánulos adecuados, y

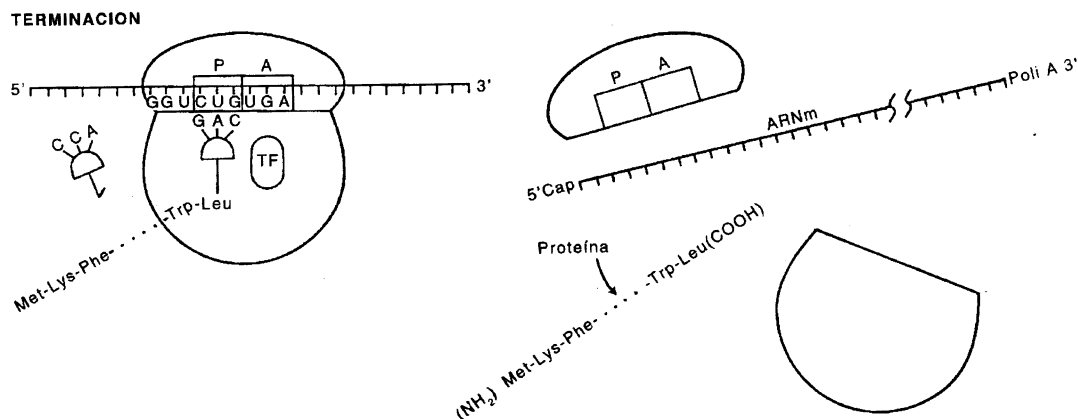


FIG. 13-9. Etapas de iniciación, elongación y terminación de la síntesis proteica en el ribosoma.

éstos deben poseer un receptor específico que reconozca esa señal. La señal de la proteína consiste en una secuencia de unos pocos aminoácidos, denominada *péptido señal*. De acuerdo con el organoide al cual se dirige y la clase de proteína, ésta puede tener un solo péptido señal, unas veces situado en el extremo de su molécula y otras en medio de ella, o varios de esos péptidos distribuidos a lo largo de la proteína.

Como es obvio, la presencia de los péptidos señal deriva de la existencia en los genes —y por ende en los ARNm— de secuencias de nucleótidos diseñadas para tal fin.

Los mecanismos por los cuales las proteínas son conducidas a sus respectivos puntos de destino han sido analizados en los capítulos dedicados al retículo endoplasmático (8-5), la mitocondria (9-27), el peroxisoma (9-34) y el núcleo (10-4).

13-16. La existencia de chaperonas en el citosol asegura la correcta formación de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas

Apenas las proteínas emergen de los ribosomas, sus átomos tienden a establecer las combinaciones químicas que dan lugar a la formación de las estructuras secundarias y terciarias que las caracterizan. Este proceso se ve facilitado —o es impedido— por ciertas proteínas citosólicas llamadas *chaperonas*, de las cuales existen varias familias, por ejemplo, la *hsp60*, la *hsp70* y la *hsp90* (por *heat shock protein*) (caps. 9-27 y 10-4).

13-17. Un tema médico vinculado con la actividad de los ribosomas

Al ser invadidas por bacterias, las células eucariotas de ciertos organismos inferiores elaboran sustancias —llamadas *antibióticos*— para defenderse de la infección. Comúnmente los antibióticos logran sus objetivos interfiriendo la síntesis proteica en los ribosomas de las bacterias, lo que provoca su muerte. Por ejemplo, la *estreptomycin* afecta el inicio de la traducción y distorsiona la fidelidad de ésta conforme la cadena proteica se alarga. La *eritromicina* impide la translocación del ARNm. La *tetraciclina* no permite que los aminoacil-ARNt^{Ami} se coloquen en el sitio A. La *puromicina* usurpa el sitio A del ribosoma, de modo que la cadena peptídica se liga al antibiótico en lugar de hacerlo con el correspondiente aminoacil-ARNt^{Ami}, y ello interrumpe su crecimiento. El *cloranfenicol* directamente impide que se produzcan las uniones peptídicas.

La medicina ha trasladado estos efectos a otros escenarios biológicos, particularmente el organismo

humano. Así, cuando determinadas bacterias lo infectan, éstas pueden ser destruidas mediante la administración adecuada de antibióticos.

Debe advertirse que la puromicina afecta también a los ribosomas de las células eucariotas, de manera que su uso farmacológico es muy restringido. Por su parte, la eritromicina, la tetraciclina y el cloranfenicol, si bien interfieren levemente la síntesis proteica en los ribosomas eucariotas citosólicos, afectan más a los *ribosomas de las mitocondrias* (cap. 9-25), lo cual refleja el origen procariótico de estos orgánoides (cap. 9-29).

REGULACION DE LA TRADUCCION DEL ARNm Y DE LA DEGRADACION DE LAS PROTEINAS

En el capítulo anterior dijimos que los procesos nucleares, es decir, la transcripción del ADN y el procesamiento del ARNm, son los más importantes para las operaciones de control y regulación de la producción de proteínas. Aunque menos generalizadas, estas operaciones pueden tener lugar en el citoplasma, en este caso regulando el tiempo durante el cual una proteína es sintetizada, el ritmo con que lo hace, cómo lo hace y la velocidad con que se degrada.

13-18. Distintos mecanismos regulan la traducción de los ARNm

Un control sobre los ARNm presentes en el citoplasma, que especifique cuáles serán traducidos —es decir, qué proteínas serán sintetizadas— y cuáles no, no ha sido probado. No obstante, existen mecanismos que controlan el número de veces que un ARNm se traduce y a qué velocidad. Como es lógico, estos mecanismos actúan en el momento en que se inician las traducciones. Las células en mitosis ofrecen claras evidencias en tal sentido, puesto que, al estar ausente la síntesis de ARNm, la caída de la producción de proteínas a partir de ARNm ya formados es evidente. Indicativa de esa caída es la apariencia que muestran los polirribosomas, en los que los ribosomas asociados a un ARNm dado aparecen más espaciados en la mitosis que en la interfase.

Existe un control general (inespecífico) de la actividad traduccional. Parece depender del factor de iniciación IF2, ya que su fosforilación por una quinasa específica lo hace inoperable y en tal circunstancia decae la síntesis de todas las proteínas de la célula. El control particular (específico) del inicio de la traducción de los ARNm opera de manera distinta. Por ejemplo, en el extremo 5' de los ARNm suelen actuar sustancias que modifican la configu-

ración del tramo de nucleótidos no traducibles ubicados entre el cap y el codón de iniciación (sección 13-5).

La *ferritina*, que es una proteína a la que se une el hierro en el citosol, nos sirve de ejemplo. Su concentración varía de acuerdo con la cantidad de hierro citosólico y su producción se regula del siguiente modo. Cuando la cantidad de hierro baja, una proteína llamada *aconitasa* (o *IRF*, por *iron responding factor*) se une al ARNm de la ferritina y bloquea su traducción. La unión se produce a nivel de la secuencia no traducible del extremo 5' del ARNm, la cual se dobla formando un bucle, causa del bloqueo del comienzo de la traducción (el bucle impediría la acción del IF4) (fig. 13-10, A).

13-19. La supervivencia de los ARNm en el citosol suele ser regulada mediante mecanismos que actúan en el extremo 3' de sus moléculas

Otra de las estrategias utilizadas por las células para controlar la cantidad de proteína que se ha de producir opera sobre la regulación de la supervivencia de los ARNm en el citosol. Los mecanismos que regulan la degradación de los ARNm son muy variados. En la mayoría de los casos están relacionados con estructuras ubicadas cerca del extremo 3' de los ARNm o en la propia poli A (sección 13-5). En determinados ARNm se vinculan con estructuras que se hallan en el extremo 5' (sección 13-5). En otros ARNm, finalmente, si bien no han sido precisadas las estructuras moleculares responsables, se conocen los inductores externos que las regulan. Analizaremos algunos ejemplos de cada una de estas situaciones, comenzando por la planteada en último término.

La *caseína* —una proteína de la leche— es producida por las células de la glándula mamaria en respuesta a determinadas hormonas, principalmente la *prolactina*. Se ha observado que la concentración del ARNm de la caseína crece considerablemente en el citosol ante la presencia de esa hormona, no porque aumente su síntesis en el núcleo sino porque aumenta su estabilidad en el citoplasma. Por lo contrario, cuando desaparece la prolactina se acelera la degradación del ARNm. No se conocen los mecanismos moleculares que producen estos efectos.

En la sangre el hierro es transportado por una proteína llamada *transferrina*. La transferrina y el hierro ingresan en el citoplasma por endocitosis después de interactuar con un *receptor* específico para la primera, localizado en la membrana plasmática de la célula. Cuando aumenta la concentración de hierro en el citosol, el número de receptores para la transferrina disminuye debido a que el

ARNm que codifica a esos receptores es degradado por una *nucleasa* específica. En este mecanismo regulatorio interviene la antes mencionada *aconitasa* (o *IRF*), que reconoce una señal ubicada en el extremo 3' del ARNm, consistente en cinco bucles de ARN consecutivos, con una secuencia CAGUG en cada uno. Así, cuando la concentración de hierro es baja la aconitasa se combina con esa señal, lo cual desactiva a la nucleasa (fig. 13-10, B). Como vemos, cuando aumenta el hierro en el citosol actúan dos mecanismos regulatorios simultáneos, uno que disminuye el número de receptores para la transferrina y otro que aumenta la concentración de la ferritina. En el primero se acelera la degradación de un ARNm; en el segundo se desbloquea la traducción de otro. En ambos interviene una misma molécula —la aconitasa—, aunque en distintos lugares de los ARNm.

Es interesante el modo como se regula la degradación del ARNm de la *tubulina* en el citosol, ya que se basa en la concentración de sus productos proteicos, es decir, las subunidades α y β (cap. 5-8). Así, cuando en el citosol el nivel de estas proteínas es suficiente, una molécula (presumiblemente un dímero de la propia tubulina) se une a los primeros cuatro aminoácidos de la cadena proteica que surge del ribosoma, tras lo cual se activa una *nucleasa* específica que degrada al ARNm que codifica a esa proteína (fig. 13-10, C). En el ARNm de la tubulina la señal que genera este mecanismo autorregulatorio incluye a sus primeros cuatro nucleótidos y a una pequeña secuencia no traducible, previa al codón de iniciación.

La vida media del ARNm de la β -*globina*, que es de unas 10 horas, depende de la integridad de su poli A. El acortamiento gradual de esta estructura —nucleasas mediante— reduce la longevidad del ARNm.

La corta supervivencia de los ARNm de otras proteínas —por ejemplo, algunos *factores de crecimiento* (cap. 15-27)—, que no supera los 30 minutos, se debe a la presencia en su extremo 3' de secuencias de unos 50 nucleótidos ricas en A y U, ubicadas entre el codón de terminación y la poli A (sección 13-5). Se ha sugerido que estas secuencias favorecen la acción de ciertas *nucleasas*, las cuales, mediante la reducción gradual de la poli A, acortan el tiempo de vida de los ARNm. Finalmente, una vez reducida la poli A, se activarían otras nucleasas para degradar las partes restantes de los ARNm.

La supervivencia de los ARNm que codifican a las *histonas* depende del momento del ciclo en que se halle la célula (fig. 13-10, D). En la fase S la vida media de estos ARNm es de una hora, pero se reduce a unos pocos minutos cuando concluye la replicación del ADN. No se conoce el mecanismo por el cual la síntesis del ADN se vincula con la

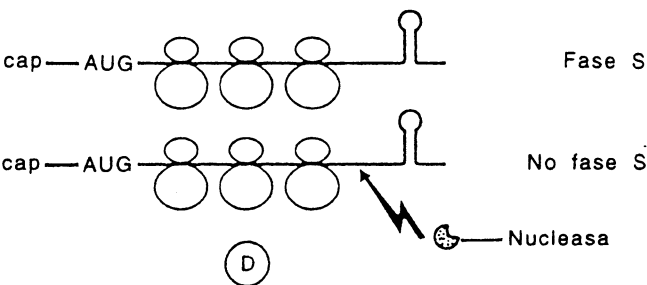
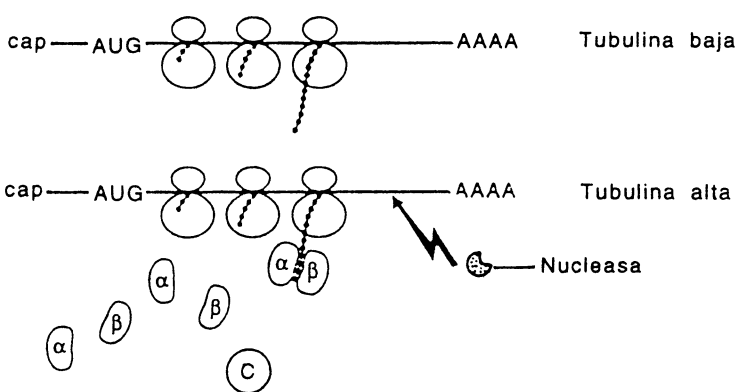
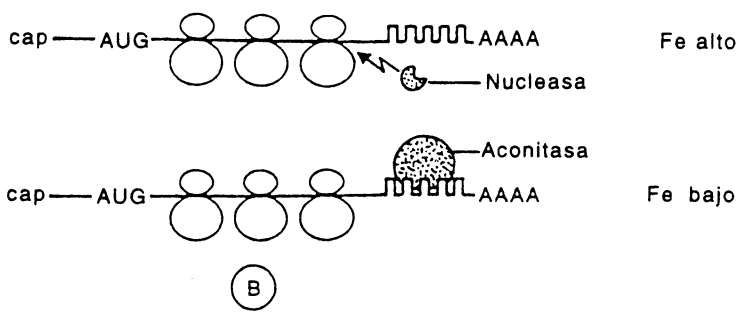
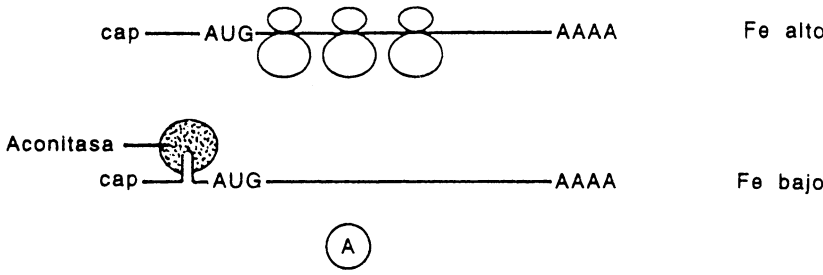


FIG. 13-10. A. Regulación de la traducción del ARNm de la ferritina. B. Regulación de la traducción del ARNm de la proteína receptora de la transferrina. C. Regulación de la estabilidad del ARNm de la tubulina. D. Regulación de la estabilidad del ARNm de las histonas.

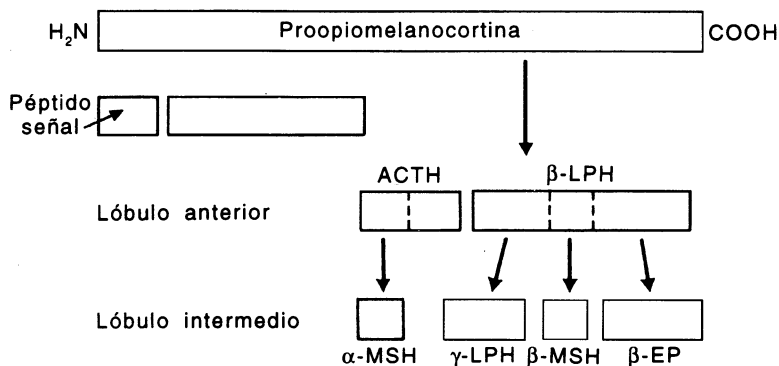


FIG. 13-11. Procesamiento de la proopiomelanocortina (POMC) según el tipo celular hipofisario que la elabore. ACTH, corticotrofina; β-LPH, β-lipotropina; γ-LPH, γ-lipotropina; α-MSH y β-MSH, hormonas estimulantes de los melanocitos; β-EP, β-endorfina.

velocidad de la degradación de estos ARNm. Sólo se sabe que su estabilidad es influida por la presencia en su extremo 3' de una corta secuencia de nucleótidos que forma un bucle (el ARNm de las histonas no posee poli A) (cap. 12-16).

Como se observa, con algunas excepciones, el tiempo de vida de los ARNm en el citosol depende de estructuras presentes en el extremo 3' de sus moléculas, donde, por acción de ciertas nucleasas, comienza su degradación.

13-20. Las poliproteínas son procesadas en forma diferente según el tipo celular

Como se expresó en el capítulo 11-1, algunos ARNm codifican *poliproteínas*. Estas se procesan de modos diferentes de acuerdo con el tipo celular. Un ejemplo de poliproteína es la prohormona *proopiomelanocortina* (POMC), que en las células corticotropas del lóbulo anterior de la hipófisis genera ACTH (corticotropina) y β-lipotropina, y en las células de la parte intermedia de la misma glándula produce las dos formas de la hormona estimulante de los melanocitos —α-MSH y β-MSH—, γ-lipotropina y β-endorfina (fig. 13-11).

13-21. La supervivencia de las proteínas también es regulada

La concentración en el citoplasma de algunas proteínas es regulada mediante el control de los procesos responsables de su degradación. La vida media de las proteínas parece depender de sus estructuras secundarias, pero fundamentalmente de su primer aminoácido, es decir, el que contiene su grupo amino libre. Recordemos que en todas las proteínas inicialmente esa posición es ocupada por una metionina y que el segundo aminoácido de la cadena toma su lugar cuando esa metionina es removida (sección 13-14).

Diversos estudios indican la existencia de una estricta correlación entre la estabilidad de las proteínas y la identidad de sus primeros aminoácidos. Así, mientras que los aminoácidos Met, Val, Gly, Ala, Thr, Ser, Pro o Cys tienen efectos estabilizadores, cualquier otro aminoácido en el extremo amino convierte a la proteína en una molécula más vulnerable a ciertas proteasas presentes en el citosol.

La degradación de las moléculas proteicas es mediada por una pequeña proteína llamada *ubiquitina*, de 76 aminoácidos. Luego de combinarse varias ubiquitinas con la proteína reconocida para su degradación, ésta es destruida por una *proteasa* específica, en una reacción que consume energía cedida por el ATP. Producida la degradación, las ubiquitinas quedan nuevamente libres en el citosol.

BIBLIOGRAFIA

- Agard D. A. (1993) How molecular chaperones work. *Science* 260:1903.
- Brawerman G. (1987) Determinants of messenger RNA stability. *Cell* 48:5.
- Brimacombe R., Stoffler G. and Wittmann H. G. (1978) Ribosome structure. *Annu. Rev. Biochem.* 47:217.
- Byörk C. R. et al. (1987) Transfer RNA modification. *Annu. Rev. Biochem.* 56:263.
- Caskey T. H. (1980) Peptide chain termination. *Trends Biochem. Sci.* 5:234.
- Cavarelli J. and Moras D. (1993) Recognition of tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases. *FASEB J.* 7:79.
- Clark B. (1980) The elongation step of protein biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 5:207.
- Craig E. A. (1993) Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. *Science* 260:1902.
- Dahlberg A. E. (1989) The functional role of rRNA in protein synthesis. *Cell* 57:525.
- Dean D. and Nomura M. (1982) Genetics and regulation of ribosomal protein synthesis in *E. coli*. *The Cell Nucleus* 12:185.
- Fischer D., Weisenberger D. and Scheer U. (1991) Assigning functions to nucleolar structures. *Chromosoma* 101:133.

- Garen A. (1968) Sense and non-sense in the genetic code. *Science* 160:149.
- Gay D. A., Yen T. J., Lau J. T. Y. and Cleveland D. W. (1987) Sequences that confer β -tubulin autoregulation through modulated mRNA stability reside within exon 1 of a β -tubulin mRNA. *Cell* 50:671.
- Guyette W. A., Matusik R. J. and Rosen J. M. (1979) Prolactin mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. *Cell* 17:1013.
- Hunt T. (1980) The initiation of protein synthesis. *Trends Biochem. Sci.* 5:178.
- Kerppola T. K. and Kane C. M. (1991) RNA polymerase: regulation of transcript elongation and termination. *FASEB J.* 5:2833.
- Lake J. A. (1981) The ribosome. *Sci. Am.* 245 (2):84.
- Lindahl L. and Hinnebusch A. (1992) Diversity of mechanisms in the regulation of translation in prokaryotes and lower eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2:720.
- Lipmann F. (1969) Polypeptide chain elongation in protein synthesis. *Science* 164:1024.
- McCarthy J. E. G. and Kollmus H. (1995) Cytoplasmic mRNA-protein interactions in eukaryotic gene expression. *TIBS* 20:191.
- McClain W. H. (1993) Transfer RNA identity. *FASEB J.* 7:72.
- Merrick W. C. (1990) Overview: mechanism of translation initiation in eukaryotes. *Enzyme* 44:7.
- Merrick W. C. (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.* 56:291.
- Miller O. L. (1981) The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity. *J. Cell. Biol.* 91:15s.
- Moore P. B. (1995) Molecular mimicry in protein synthesis? *Science* 270:1453.
- Mullner E. W. and Kuhn L. C. (1988) A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* 53:815.
- Nierhaus K. H. (1980) The assembly of the prokaryotic ribosome. *Bio Systems* 12:273.
- Nierhaus K. H. (1996) An elongation factor turn-on. *Nature* 379:491.
- Nissen P. et al. (1995) Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu, and a GTP analog. *Science* 270:1464.
- Noller H. F. (1984) Structure of ribosomal RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 53:119.
- Nomura M. (1973) Assembly of bacterial ribosomes. *Science* 179:864.
- Ochoa S. (1979) Regulation of protein synthesis. *Crit. Rev. Biochem.* 7:7.
- Ochoa S. (1981) Molecular mechanisms of control of protein biosynthesis. *Eur. J. Cell Biol.* 26:212.
- Oh S. K. and Sarnow P. (1993) Gene regulation: translational initiation by internal ribosome binding. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:295.
- Prince J. B., Gutell R. R. and Garret R. A. (1983) A consensus model of the *E. coli* ribosome. *Trends Biochem. Sci.* 8:359.
- Rassow J. and Pfanner N. (1996) Protein biogenesis: chaperones for nascent polypeptides. *Curr. Biol.* 6:115.
- Reeder R. H. (1974) Ribosomes from eukaryotes: Genetics. In: *Ribosomes*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Rhoads R. E. (1993) Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors. *J. Biol. Chem.* 268:3017.
- Rich A. and Kim S. H. (1978) The three-dimensional structure of transfer RNA. *Sci. Am.* 240 (1):52.
- Sachs A. B. (1993) Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* 74:413.
- Schimmel P. R. (1987) Aminoacyl-tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 56:125.
- Shine J. and Dalgarno L. (1974) The 3' terminal sequence of *E. coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1342.
- Tate W. P. and Brown C. M. (1992) Translational termination: "stop" for protein synthesis or "pause" for regulation of gene expression. *Biochemistry* 29:5881.
- Theil E. C. (1990) Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J. Biol. Chem.* 265:4771.
- von Ahlsen W. and Noller H. F. (1995) Identification of bases in 16S rRNA essential for tRNA binding at the 30S ribosomal P site. *Science* 267:234.
- Weissbach H. and Ochoa S. (1976) Soluble factors required for eukaryotic protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 45:191.
- Wittmann H. G. (1976) Structure, function and evolution of ribosomes. *Eur. J. Biochem.* 61:1.
- Yonath A., Leonard K. R. and Wittman H. G. (1987) A tunnel in the large ribosomal subunit revealed by three-dimensional image reconstruction. *Science* 236:813.

14/ Replicación del ADN

José Hib

14-1. Introducción

Al cabo de la división celular, las células hijas heredan la misma información genética contenida en la célula progenitora. Como esa información se halla en el ADN, cada una de sus moléculas debe generar previamente dos moléculas de ADN idénticas a la del ADN originario para ser repartidas de manera equitativa entre las dos células hijas. Esta duplicación, gracias a la cual el ADN se propaga en las células de generación en generación, lleva el nombre de *replicación*.

Para que se puedan formar dos moléculas de ADN a partir de una, primero deben separarse las dos cadenas de la doble hélice del ADN preexistente, las cuales sirven de moldes para la construcción de sendas cadenas complementarias. Dado que las cadenas recién construidas permanecen con las cadenas moldes, quedan formadas dos nuevas dobles hélices de ADN (fig. 14-1). Hemos visto que el ADN no está solo sino combinado con pro-

teínas (histonas, etc.) y que la integración de ambas moléculas lleva el nombre de cromatina (fig. 10-6). La presencia de tales proteínas complica el estudio de la replicación, por un lado porque ellas también se duplican, y por el otro porque son responsables del enrollamiento de la cromatina. Con el objeto de simplificar las descripciones, estos aspectos serán ignorados en las primeras secciones del capítulo, excepto cuando sus menciones resulten imprescindibles.

La vida de las células transita por dos etapas que se alternan cíclicamente, conocidas con los nombres de *interfase* y *mitosis* (cap. 15-2). La interfase se subdivide en tres períodos, llamados G1, S y G2 (fig. 14-2). En la *fase G1* tienen lugar las distintas actividades de la célula (secreción, conducción, contracción, endocitosis, etc.). Le sigue la *fase S*, en cuyo transcurso se produce la replicación del ADN. Luego tiene lugar la *fase G2*, que se extiende hasta el inicio de la *fase M* —llamada mitosis o división celular—, al cabo de la cual las moléculas

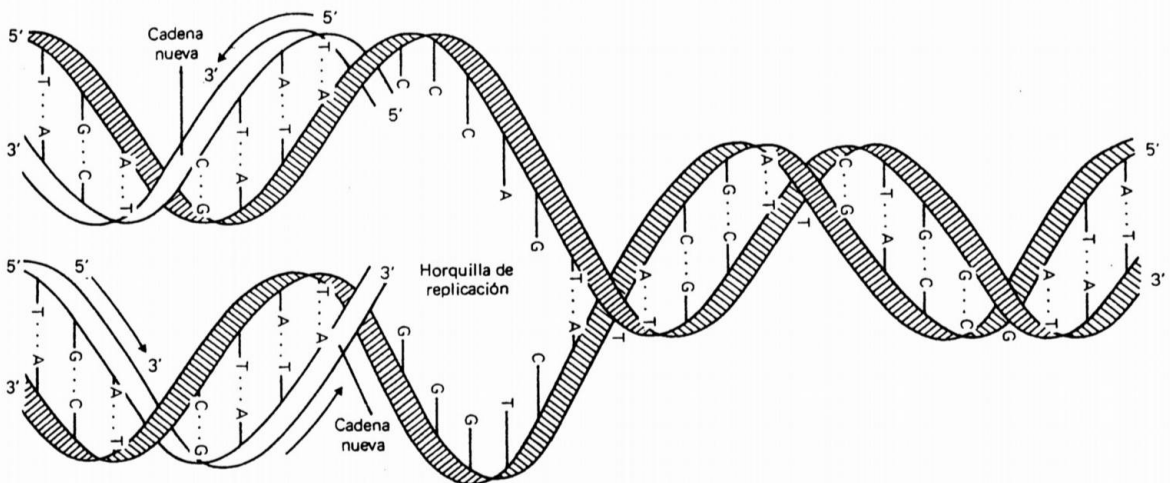


FIG. 14-1. La replicación del ADN se produce previo desenrollamiento de las dos cadenas de la doble hélice, usándose cada una como molde para sintetizar las nuevas cadenas. Obsérvese que la síntesis tiene lugar únicamente en la dirección 5'→3'.

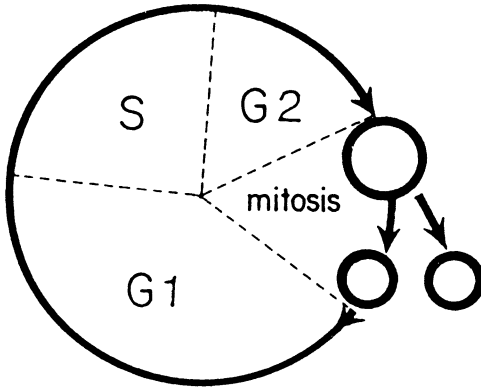


FIG. 14-2. Ciclo vital de una célula, que comprende la interfase y la mitosis. La primera incluye las fases G1, S y G2. La replicación del ADN ocurre durante la fase S.

de ADN duplicadas se segregan entre las células hijas. Debe señalarse que desde la terminación de la fase S hasta su segregación en la mitosis, los ADNs hijos derivados de un mismo ADN progenitor permanecen juntos, unidos por el centrómero (fig. 10-5). Mientras están unidos, tales ADNs llevan el nombre de cromátidas hermanas. El centrómero se evidencia cuando la cromatina de ambas cromátidas alcanza el máximo grado de compactación durante la mitosis; desempeña un papel crucial en la separación de las cromátidas hermanas, al hacer que cada célula hija reciba una sola cromátida, que pasa a llamarse cromosoma después de la separación (cap. 15-9) (fig. 14-3).

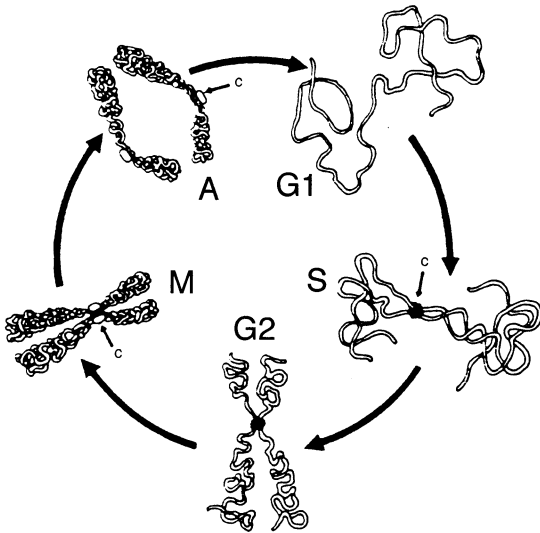


FIG. 14-3. Ciclo de condensación-descondensación de los cromosomas. En S se produce la replicación. La condensación del ADN es máxima en la metafase (M) y en la anafase (A). Obsérvese la presencia del centrómero, particularmente visible en la metafase y en la anafase.

14-2. La replicación tiene algunas similitudes con la transcripción

La síntesis del ADN (replicación) presenta algunas similitudes con la síntesis del ARN (transcripción). Como el ARN, el ADN se sintetiza en dirección $5' \rightarrow 3'$ y utiliza como molde una cadena de ADN preexistente. Además, enzimas equivalentes a las ARN polimerasas, llamadas *ADN polimerasas*, agregan los sucesivos nucleótidos —también de a uno por vez— en el extremo $3'$ de la cadena en crecimiento. Las ADN polimerasas catalizan las uniones fosfodiéster entre el grupo OH en el $C3'$ de la desoxirribosa de un nucleótido y el grupo fosfato en el $C5'$ del nucleótido recién arribado (fig. 14-4).

Veamos las diferencias, debidas en parte a que el ADN es una molécula doble y no una cadena simple como el ARN. En la síntesis del ARN, el ADN se transcribe sólo en los sectores correspondientes a los genes activos, mientras que en la replicación no queda ningún segmento del ADN sin duplicar. La replicación exige un número considerablemente mayor de enzimas que la transcripción. Para la síntesis del ARN, las dos cadenas del ADN se separan transitoriamente en la zona por la que avanza la transcripción, de modo que se forma una especie de “burbuja” que se desplaza en dirección $5' \rightarrow 3'$. El ARN copia una sola de las dos cadenas del ADN y —conforme progresa la transcripción— el ARN se despegue de la cadena que le sirve de molde. Contrariamente, en la replicación las dos cadenas del ADN se separan totalmente, ambas son usadas como moldes y, dado que las cadenas hijas se quedan junto a las progenitoras, éstas, como es obvio, no se vuelven a juntar.

En consecuencia, a partir de la doble hélice de una molécula de ADN se originan dos moléculas de ADN —dos dobles hélices—, ambas compuestas por una cadena heredada del ADN progenitor y una cadena recién sintetizada. Como al cabo de la mitosis cada célula hija recibe moléculas de ADN cuyas dobles hélices están integradas por una cadena original (preexistente) y una cadena nueva (recién sintetizada), se dice que el mecanismo de replicación del ADN es *semiconservador* (fig. 14-5).

14-3. La replicación se produce sectorialmente

Si la célula abordara la replicación de las moléculas de ADN tomándolas como uno las imagina en el núcleo, formando largas, uniformes y delicadísimas hebras compuestas por millones de pares de nucleótidos apareados que deben separarse en un momento dado en toda su extensión, la tarea, por un elemental problema de espacio, no podría concretarse. A pesar de que, desde el punto de vista teórico, el ADN exhibe las características que

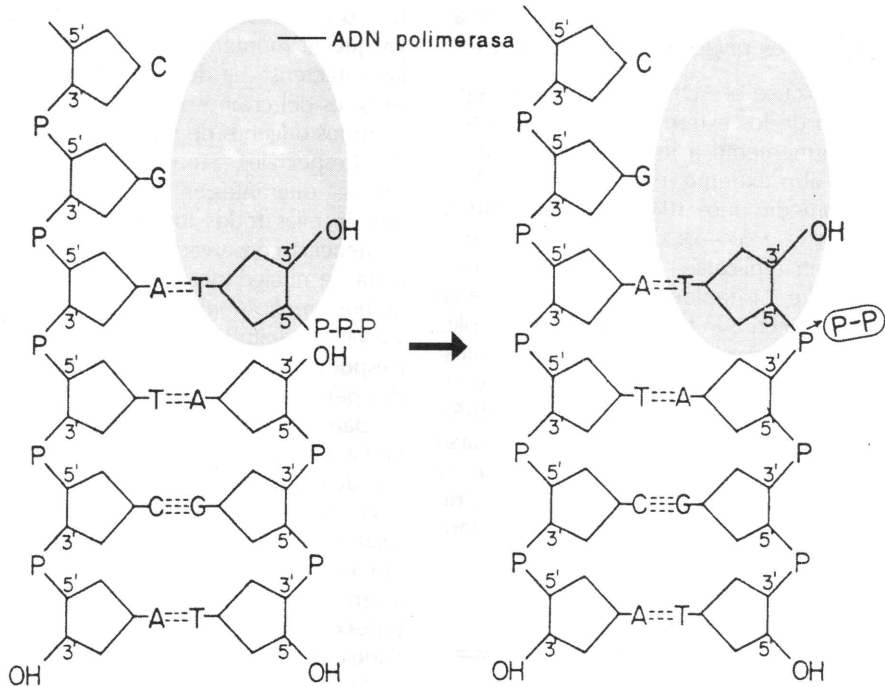


FIG. 14-4. Acción de la ADN polimerasa durante la replicación del ADN. La enzima ubica en su lugar a un nucleósido trifosfato y cataliza la unión fosodiéster, con liberación de un difosfato. Se observa que la ADN polimerasa sólo puede agregar nucleótidos en la dirección 5'→3'.

acabamos de mencionar, el problema no se presenta, debido al modo como se asocian sus moléculas a las histonas y se enrollan sobre sí mismas.

Recordemos que el ADN integra los nucleosomas y se enrolla hasta generar una estructura helicoidal de 30 nm de diámetro, que su vez se enrolla sobre sí formando lazos de diferente longitud, los cuales emanan de un eje constituido por proteínas no histónicas (fig. 10-10). Los dos extremos de cada lazo se sujetan a dicho eje por medio de tramos de ADN llamados SARs (cap. 10-9). Esta disposición de la cromatina, además de proteger al ADN de eventuales enredos, nudos y roturas, lo organiza sectorialmente, ya que —como veremos de inmediato— los lazos de 30 nm representan *unidades de replicación* del ADN. En los capítulos 10-9 y 12-12 se dijo que probablemente algunos lazos también constituyan unidades de transcripción, es decir, genes.

Cuando se habla de unidades de replicación se quiere significar que el ADN no se sintetiza globalmente sino a partir de múltiples segmentos a lo largo de su molécula, cada uno de los cuales corresponde a un lazo. Por consiguiente, cada unidad abarca al ADN comprendido entre los puntos de origen y de llegada del lazo a su base, es decir, entre las SARs. Es necesario advertir que tal sectorización no supone la existencia de algún tipo de interrupción en la continuidad del ADN, ya que la

condición unitaria de su molécula no se pierde, por lo menos normalmente. La estrategia de sectorizar la replicación del ADN podrá ser valorada en las próximas secciones, cuando se analicen las múltiples complicaciones que debe sortear la célula para que tal proceso pueda concretarse.

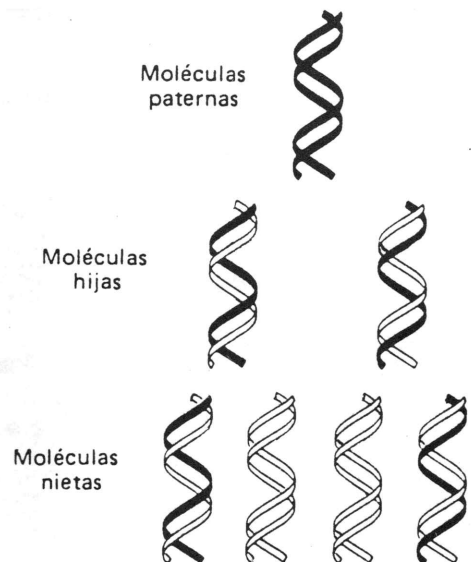


FIG. 14-5. Replicación semiconservadora del ADN.

14-4. La duplicación del ADN es generada a partir de múltiples orígenes de replicación

Si para sintetizarse el ADN comenzara su replicación por uno de los extremos del cromosoma y avanzara uniformemente a lo largo de éste hasta concluir en el otro extremo, el proceso de síntesis tardaría en promedio unos 30 días. No obstante, la duración de la fase S —es decir, el tiempo que tarda el ADN en replicarse— es de unas 7 horas aproximadamente. La rapidez con que lo hace se debe a que aparecen a lo largo del ADN múltiples *orígenes de replicación* —no deben confundirse con las unidades de replicación—, entre 20 y 80 por cada lazo de cromatina de 30 nm (fig. 10-5). Cada origen de replicación se gesta al separarse localmente las dos cadenas del ADN, hecho que se produce, como dijimos, en muchísimos puntos de la molécula a la vez (figs. 14-6 y 14-7). No obstante,

te, no todos los orígenes nacen simultáneamente, ya que el momento de su aparición depende de las características de la cromatina en los distintos sectores del cromosoma.

En los orígenes de replicación hay secuencias de ADN especiales —formadas por cientos de nucleótidos—, diferentes en cada origen. Empero, en medio de ellas todos los orígenes tienen en común secuencias conservadas de alrededor de una docena de nucleótidos, denominadas *ARS* (por *autonomous replication sequence*) (cap. 10-6). Como se vio en el capítulo 10-7, es posible que las *ARS* correspondan a las secuencias repetidas de nucleótidos pertenecientes a la familia *Alu*. Estas contienen 14 pares de nucleótidos e incluyen dos secuencias GAGGC, idénticas a las halladas en la *ARS* del origen de replicación del ADN circular del virus SV40.

Los pares de nucleótidos correspondientes a esas secuencias especiales se separan al ser inducidos por factores proteicos aún no caracterizados. Del mismo modo que los factores reguladores de la transcripción, estas proteínas reconocen singularidades químicas expuestas en el surco mayor del ADN, es decir, en la superficie exterior de la doble hélice (cap. 12-10) (fig. 12-5).

14-5. La replicación del ADN es un proceso bidireccional

Al abrirse la doble hélice se forma una estructura llamada *burbuja de replicación*, cuyo tamaño aumenta a medida que avanza la separación de las dos cadenas del ADN, fenómeno que se produce en forma simultánea en los dos extremos de la burbuja. Se establece de esta manera, en cada uno de esos extremos, una estructura con forma de Y —llamada *horquilla de replicación*—, cuyos brazos representan a las cadenas del ADN ya separadas y el tronco a la doble hélice en vías de separación (figs. 14-1 y 14-8).

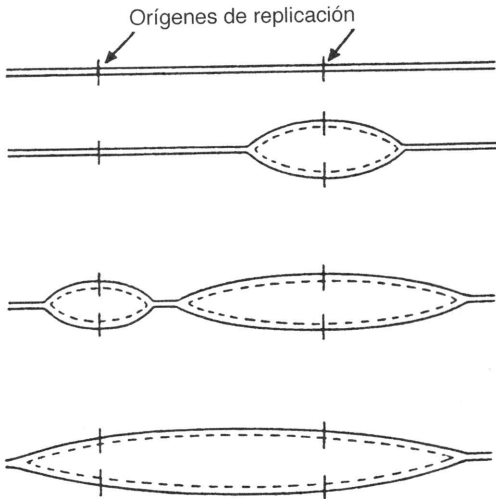
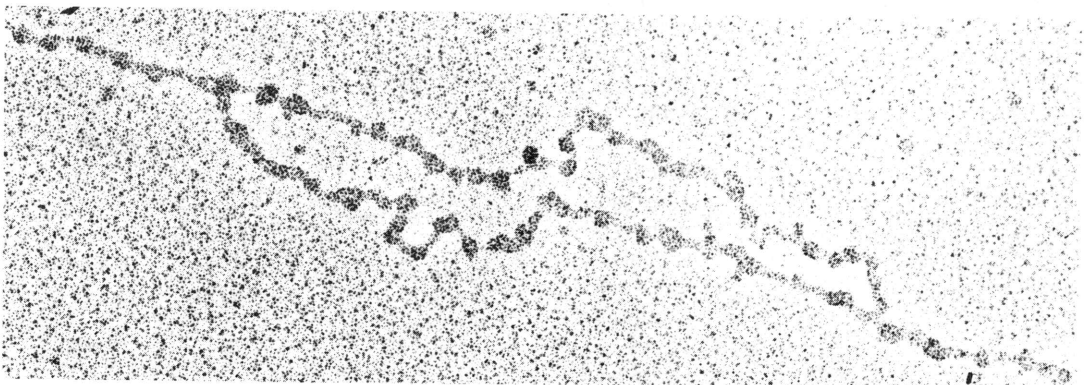


FIG. 14-6. Esquema que muestra dos orígenes de replicación contiguos en un sector del cromosoma.



14-7. Un sector cromatínico durante la replicación. (Cortesía de S. L. McKnight y O. L. Miller Jr.)

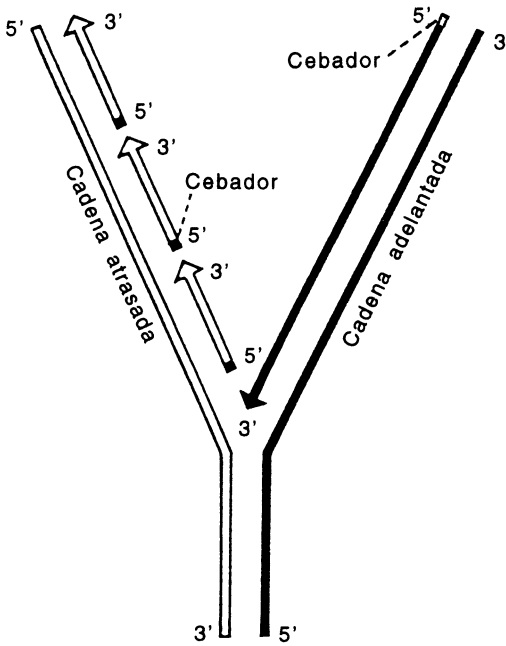


FIG. 14-8. La replicación es bidireccional. Además es continua en una cadena (adelantada) y discontinua en la otra (atrasada).

Así, cada burbuja tiene dos horquillas de replicación que a partir de un punto de origen común avanzan en direcciones opuestas. Las horquillas desaparecen cuando se integran con sus similares de las burbujas contiguas, al colisionar después que culmina el acercamiento progresivo entre ellas (fig. 14-9). Respecto de las horquillas que recorren el último tramo de los telómeros —en ambos extremos del cromosoma—, se extinguen cuando se produce la separación del postrer par de nucleótidos.

El tramo de ADN que se sintetiza a partir de un origen de replicación —con sus dos horquillas— recibe el nombre de *replicón*. En consecuencia, la replicación concluye cuando se conectan entre sí los sucesivos replicones. La acción cooperativa de miles de ellos es la que permite que el ADN se sintetice en un tiempo relativamente breve para el ciclo de vida de la célula.

14-6. Existen diferencias en el modo como se sintetizan las dos cadenas nuevas de ADN

Si bien hasta el momento hemos analizado la estrategia general usada por la célula para replicar su ADN en el menor tiempo posible, poco hemos dicho sobre la propia síntesis del ADN, y menos sobre los detalles moleculares que dan lugar a la separación de sus cadenas. Solo adelantamos que necesita un molde de ADN preexistente, enzimas llamadas ADN polimerasas, y que tiene lugar por el agregado de nucleótidos en el extremo 3' de las cadenas hijas.

Precisamente, esta última condición, asociada al hecho de que las dos cadenas del ADN son antiparalelas, crea una primera dificultad durante la síntesis. Es que a nivel de cada horquilla de replicación, conforme sus dos cadenas se separan, una presenta sus nucleótidos corriendo en dirección $5' \rightarrow 3'$ y la otra en dirección $3' \rightarrow 5'$, de modo que la primera, al ser copiada, debería gestar una cadena hija que crezca en dirección $3' \rightarrow 5'$, algo que ninguna ADN polimerasa puede hacer.

La célula resuelve esta situación utilizando estrategias distintas en la construcción de las dos cadenas nuevas. La cadena hija que adopta como molde a la cadena progenitora que corre en dirección $3' \rightarrow 5'$ se construye, al crecer en dirección $5' \rightarrow 3'$,

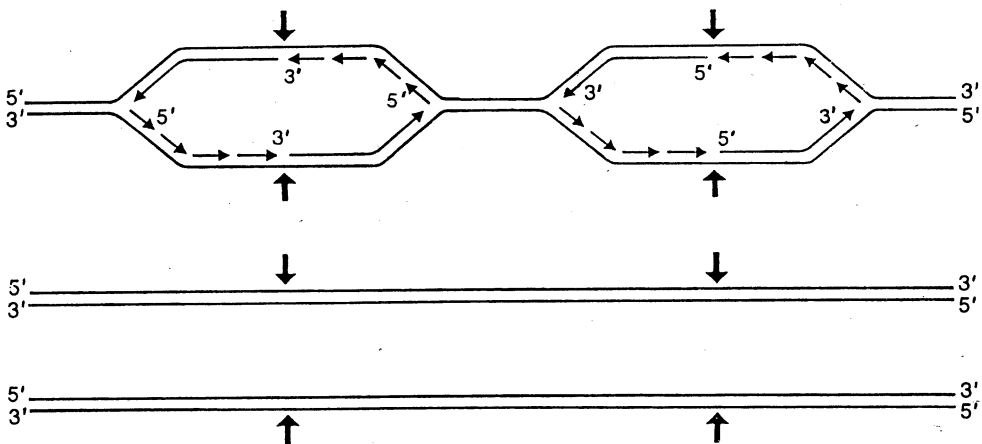


FIG. 14-9. Esquema que muestra dos replicones contiguos y los puntos donde se origina la replicación (flechas). Además puede observarse el carácter bidireccional de la replicación y los sectores en que el ADN se sintetiza en forma continua y discontinua.

en forma *continua* mediante el agregado de nucleótidos en su extremo 3' a medida que avanza la horquilla de replicación (fig. 14-8). En cambio, la otra cadena hija, cuyo molde es la cadena del ADN progenitor que corre en dirección 5'→3', es sintetizada de un modo singular, ya que para poder crecer en esa dirección debe sintetizarse en dirección opuesta al avance de la horquilla de replicación. El problema se supera haciendo que la síntesis sea *discontinua*, lo cual significa que la nueva cadena se construye de pequeños tramos —llamados *fragmentos de Okazaki*—, los cuales se ligan entre sí a medida que se generan (fig. 14-8).

La figura 14-10 muestra la única manera como este proceso puede concretarse: cada fragmento de Okazaki se sintetiza mediante la copia de un tramo de la cadena progenitora relativamente alejado del ángulo de la horquilla, “por detrás” del último fragmento de Okazaki construido. Así, el tramo progenitor más cercano a la horquilla permanece sin copiar, aunque a esa altura la cadena continua ya fue copiada. Por tal motivo, a la cadena que se sintetiza en forma continua se la conoce con el nombre de “*adelantada*” y a la discontinua se la llama “*retrasada*”.

La replicación del ADN es un proceso *bidireccional* no sólo porque se produce en dos direcciones divergentes a partir de una misma burbuja de replicación, sino también porque las cadenas de la doble hélice son sintetizadas en direcciones opuestas. Además es *asimétrica*, ya que, tomando como referencia a una de las dos cadenas del ADN, de un lado de la burbuja la replicación es continua, mientras que en el otro lado es discontinua. La

síntesis continua avanza en la misma dirección en que lo hace la horquilla de replicación, mientras que la discontinua lo hace en dirección contraria. En síntesis, cada replicón tiene cuatro áreas generadoras de ADN, dos que crecen de manera continua (una en cada cadena del ADN progenitor) y dos de manera discontinua (también una en cada cadena del ADN progenitor, pero cruzadas con las primeras) (fig. 14-9).

A continuación analizaremos de qué modo se sintetiza el ADN en las cadenas continua (adelantada) y discontinua (atrasada). Por motivos didácticos lo haremos separadamente, aunque estos procesos —como los analizados hasta ahora y todos los que se explicarán— tienen lugar en forma simultánea. Más aún, las enzimas que intervienen en su dirección se encuentran asociadas formando un complejo multienzimático que se comporta como una verdadera maquinaria de replicación.

14-7. La cadena de ADN sintetizada en forma continua comienza a replicarse a partir de un cebador

Para iniciar la síntesis de una cadena complementaria de ADN, además de una cadena de ADN molde, la ADN polimerasa necesita un *cebador*, que consiste en una pequeña pieza de ARN de unos 10 nucleótidos de largo (fig. 14-8). La formación del cebador es catalizada por una ARN polimerasa específica, la *ADN primasa*, que se diferencia de la ARN polimerasa vista en el capítulo 12-3 porque genera ARN cortos que quedan asociados al tramo de ADN que copian.

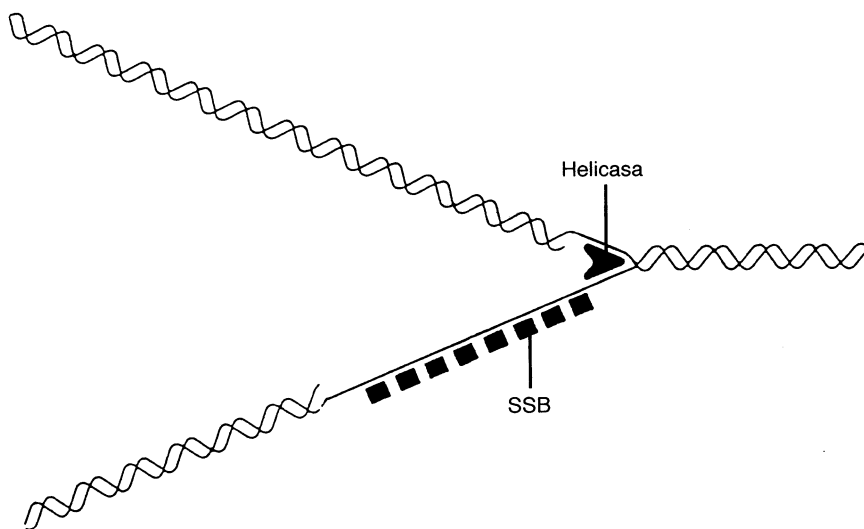


FIG. 14-10. Cadenas adelantada (continua) y atrasada (discontinua) del ADN durante la replicación. La helicasa separa a las dos cadenas del ADN y las proteínas SSB evitan autoapareamientos entre las bases complementarias libremente expuestas en la cadena atrasada.

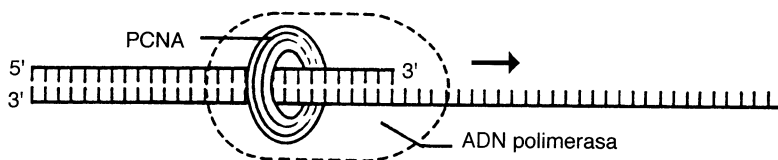


Fig. 14-11. Unión del aro de PCNA a la ADN polimerasa.

Formado el cebador, la síntesis del ADN prosigue si la ADN polimerasa dispone de suficientes nucleótidos, que pasan al núcleo bajo la forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP y dGTP). Estos se agregan secuencialmente a la cadena en crecimiento de acuerdo con los nucleótidos presentes en la cadena de ADN que sirve de molde. La mayor parte de la energía requerida para los procesos que tienen lugar durante la replicación es tomada de los propios desoxirribonucleósidos trifosfato, que se hidrolizan —con liberación de energía— cuando se ligan entre sí.

Al iniciarse la síntesis continua del ADN, en cada origen se forman, dada la naturaleza bidireccional de la replicación, dos cebadores orientados divergentemente, uno en cada cadena de la doble hélice. Seguidamente, la *ADN polimerasa* δ , enzima que cataliza la síntesis de la cadena continua, agrega un nucleótido en el extremo 3' del cebador y luego hace lo propio con los sucesivos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena en crecimiento, hasta arribar la horquilla al extremo del replicón.

Una característica saliente de las ADN polimerasas es su tendencia a desprenderse del ADN. No obstante, mientras hacen su trabajo permanecen unidas a éste debido a que son sostenidas por un *aro proteico deslizante*. Como muestra la figura 14-11, el aro se une a la polimerasa y no al ADN, de ahí que impida el desprendimiento de la enzima pero no su deslizamiento. Está formado por tres subunidades monoméricas —cada una integrada por un par de dominios topológicamente idénticos— que al combinarse componen el anillo (fig. 14-12). El aro se libera de la ADN polimerasa apenas ésta detiene su movimiento, cuando alcanza el extremo del replicón. Sólo entonces la enzima se desprende del ADN. La proteína que compone el anillo se denomina *PCNA* (por *proliferating cell nuclear antigen*).

Una vez que la horquilla de replicación arriba al extremo del replicón, la cadena continua recién formada toma contacto con la cadena discontinua del replicón adyacente, que avanzaba en dirección contraria. Entre ambas cadenas, otra enzima, la *ADN ligasa*, une el extremo 3' de la primera con el extremo 5' de la segunda (fig. 14-9). Como es obvio, esto no puede ocurrir en los extremos de los telómeros, de ahí que en ellos la replicación culmine de un modo distinto, cuyo análisis dejamos para más adelante.

Entre tanto, donde se iniciara la síntesis de la cadena continua, el cebador es removido por una *nucleasa reparadora* —será descrita en la sección 14-20 cuando se analice la reparación del ADN— y su lugar es reemplazado por una pieza de ADN equivalente, generada con ayuda de una ADN polimerasa especial, la *ADN polimerasa* β . Finalmente, esta pieza de ADN se conecta con el resto de la cadena continua también mediante la ADN ligasa.

14-8. La cadena de ADN sintetizada en forma discontinua requiere muchos cebadores

Como se acaba de ver, la cadena continua necesita un solo cebador, que se forma apenas aparece la horquilla al comienzo de la replicación. En cambio, la cadena discontinua requiere varios, uno para cada fragmento de Okazaki (fig. 14-8). La ADN primasa que sintetiza tales cebadores se desliza junto a la ADN polimerasa responsable de la síntesis discontinua del ADN, que es la *ADN polimerasa* α . Esta enzima, tras agregar el nucleótido adecuado en el extremo 3' del cebador, coloca los sucesivos nucleótidos en el extremo 3' del fragmento de Okazaki en crecimiento, interrumpiéndose su labor cuando ese extremo colisiona con el cebador del fragmento formado precedentemente. El cebador es eliminado por una nucleasa reparadora y su lugar lo ocupa una pieza de ADN equivalente, sintetizada por la ADN polimerasa β . El proceso culmina al actuar la ADN ligasa, que conecta el extremo 3' de esa pieza de ADN con el extremo 5' de la cadena discontinua.

Los fragmentos de Okazaki alcanzan una longitud media de alrededor de 200 nucleótidos. La ARN primasa y la ADN polimerasa α necesitan unos 4 segundos para construir el cebador y agregar esos 200 nucleótidos. Una vez completada la síntesis de un fragmento, ambas enzimas se liberan de la doble hélice y juntas retornan hacia el ángulo de la horquilla de replicación, dejando atrás los 200



Fig. 14-12. Las tres subunidades proteicas que componen el aro de PCNA.

nucleótidos del fragmento que acaban de sintetizar más otros tantos del ADN molde, los cuales se usarán para copiar el próximo fragmento de Okazaki.

Como ocurre con la ADN polimerasa δ en movimiento, la ADN polimerasa α no se desprende del ADN debido a que se le asocia un aro de PCNA. Dada la pequeñez de los fragmentos de Okazaki, la ADN polimerasa α se mantiene prendida al ADN por períodos muy breves.

Hemos visto que en los orígenes de replicación cada una de las cadenas de la doble hélice da lugar a una cadena que crece en forma continua y otra que lo hace —en dirección contraria— en forma discontinua. Como resultado de la singular construcción de la cadena discontinua, su extremo 3' es el extremo 3' del primer fragmento de Okazaki sintetizado, y su extremo 5', el extremo 5' del último fragmento formado. Este fragmento, una vez eliminado su cebador, se liga por su extremo 5' al extremo 3' de la cadena continua del replicón adyacente, que avanzaba en dirección contraria (fig. 14-9). Por su parte, el fragmento formado en primer término se liga por su extremo 3' al extremo 5' de la cadena continua del mismo replicón, en el lugar en que se iniciara la síntesis de ambas en direcciones divergentes.

Como se señaló, el primer fragmento de Okazaki de la cadena discontinua se forma —en el nacimiento de la horquilla de replicación— tras haberse sintetizado un trecho de la cadena continua. Dado que el desfase se prolonga hasta el fin de la replicación, a la cadena discontinua se la llama también “retrasada”. Como consecuencia de este retraso, la rama de la horquilla que sirve de molde para la síntesis de la cadena discontinua muestra en forma permanente un tramo de ADN sin replicar, comprendido entre el cebador del último fragmento de Okazaki y el ángulo de la horquilla.

Como puede apreciarse en la figura 14-10, este tramo de ADN es cubierto por unas proteínas llamadas SSB (por *single-strand DNA binding*), que tienen la propiedad de asociarse en forma cooperativa con cadenas de ADN simples. La presencia de estas SSB le confiere cierta rigidez al tramo en cuestión, lo cual impide la formación de apareamientos indeseables entre bases complementarias de la propia cadena. No obstante, como las bases de los nucleótidos permanecen expuestas, ese tramo de ADN puede ser utilizado como molde para la construcción de un nuevo fragmento de Okazaki. A medida que la ADN polimerasa α agrega los sucesivos nucleótidos en el extremo 3' de este fragmento, las proteínas SSB se van desprendiendo del ADN y vuelven a asociarse al ADN simple que va quedando expuesto conforme avanza la horquilla de replicación.

14-9. En los telómeros la replicación del ADN es dirigida por la telomerasa

En los telómeros, la conclusión de la síntesis de la cadena discontinua tiene características particulares. Una vez eliminado el último cebador en la punta del telómero, la ADN polimerasa β no puede construir la pieza de ADN que lo reemplaza pues carece de un grupo 3' preexistente a partir del cual esa pieza pueda crecer. Como consecuencia, en las sucesivas divisiones celulares, con cada salida del cebador se pierde un tramo de ADN de igual tamaño, lo que provoca el progresivo acortamiento del telómero. Naturalmente, si las células no le pusieran límite a este acortamiento, a partir de un momento comenzarían a perder información genética. Esto se evita porque periódicamente los tramos de ADN perdidos son reconstruidos, lo cual depende de una singular secuencia de nucleótidos presente en la cadena 5'→3' de los telómeros y de un complejo enzimático llamado *telomerasa*, integrado por una pequeña pieza de ARN y varias proteínas (fig. 14-13).

La cadena 5'→3' de los telómeros contiene, varias veces repetida, la secuencia de nucleótidos GGGTTA, que es la que se pierde —una por vez— en cada división celular. La reconstrucción del telómero comienza cuando la telomerasa se une al extremo 3' de esa cadena, pero colocándose en el lado de la cadena 3'→5', como muestra la figura 14-13. La cadena 5'→3' crece en la dirección correcta merced a que tiene todo lo necesario para hacerlo: un grupo 3' libre y una secuencia de nucleótidos que le sirve de molde, cedida por el ARN de la telomerasa. Obsérvese que de ese ARN queda expuesto el oligonucleótido CCCAAU, complementario de la secuencia GGGTTA correspondiente a la cadena 5'→3' del telómero. El proceso se reitera una y otra vez, hasta que la cadena 5'→3' recupera las pérdidas de ADN experimentadas en las replicaciones anteriores. A continuación, la ADN polimerasa α , partiendo del grupo 3' del ARN de la telomerasa —en reemplazo del cebador—, sintetiza el tramo telomérico faltante en la cadena 3'→5' (discontinua) usando como molde el ADN de la cadena 5'→3' recién sintetizado. Por último, la ADN ligasa conecta el extremo 3' de ese tramo con el extremo 5' de la cadena 3'→5', y la telomerasa se libera. Debe señalarse que no existe un balance exacto entre las pérdidas teloméricas y sus recuperaciones periódicas, de ahí que el largo de los telómeros sea diferente en los distintos cromosomas.

En medios de cultivo las células normales provenientes de embriones o de individuos jóvenes se dividen más veces que las células procedentes de individuos de más edad. Se ha sugerido que las

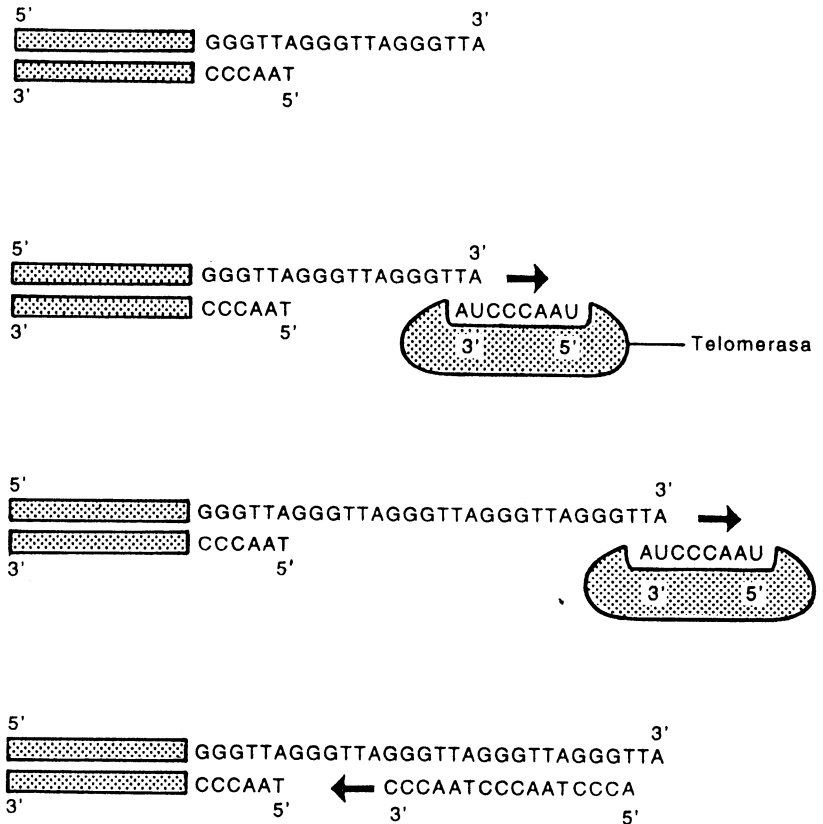


FIG. 14-13. Esquema que muestra el rol de la telomerasa en la replicación del ADN a nivel de los telómeros.

células envejecidas mueren antes debido a que sus telómeros, una vez acortados, no recuperan su tamaño, y que la muerte celular se produce cuando la longitud telomérica queda por debajo de ciertos límites. Esta correlación entre el acortamiento de los telómeros y el envejecimiento celular ha sido observada recientemente. La causa del acortamiento de los telómeros derivaría de una reducción progresiva de la síntesis de la enzima telomerasa a medida que transcurren las generaciones celulares. Llamativamente, en las células cancerosas esa síntesis se halla aumentada, lo cual daría lugar a disfunciones en los telómeros y a las perpetuas divisiones que experimentan estas células cuando se las cultiva.

14-10. La topoisomerasa I y la girasa disminuyen la tensión torsional que se produce en la doble hélice del ADN al separarse sus dos cadenas por la acción de la helicasa

Como el ADN es una molécula compuesta por dos cadenas helicoidales apareadas y enrolladas entre sí, su formación presenta una dificultad adicional, soslayada hasta ahora para no complicar el análisis de los puntos anteriores.

Hemos visto que las ADN polimerasas pueden copiar los nucleótidos del ADN una vez que las cadenas de esta molécula han sido separadas. Tal separación es dirigida por una enzima específica llamada *helicasa*, la cual, situándose en la horquilla de replicación por delante de la ADN polimerasa δ , se encarga de eliminar los puentes de H que unen las bases complementarias de las dos cadenas de la doble hélice (fig. 14-10). Este proceso requiere energía, que es cedida por el ATP.

A medida que avanza la horquilla de replicación, la helicasa deja tras de sí tramos de las dos cadenas del ADN con sus nucleótidos expuestos. Recordemos que para dar lugar a la cadena discontinua, los nucleótidos de la cadena progenitora 5'→3' permanecen un tiempo sin replicar y deben combinarse con las proteínas SSB para evitar que se produzcan apareamientos entre ellos.

La helicasa no puede abrir la doble hélice del ADN como si abriera un cierre relámpago. La causa de esa restricción deriva de la naturaleza helicoidal del ADN. Así, en una situación similar a la mostrada en la figura 14-14, conforme las cadenas del ADN se separan a nivel de la horquilla de replicación, se va acumulando por delante de ésta —en la doble hélice no abierta todavía— un enrollamiento cada vez mayor. Como es de suponer, por arriba de

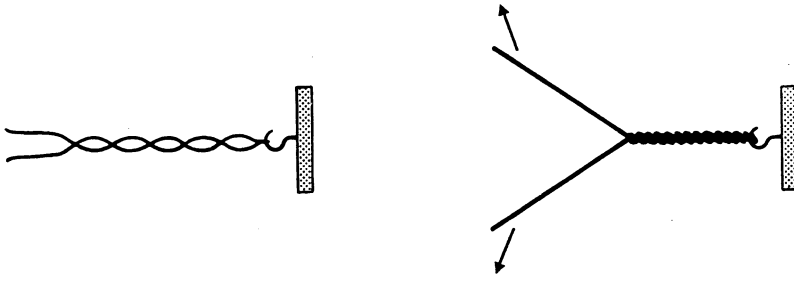


FIG. 14-14. Separación progresiva de las dos cadenas del ADN a nivel de la horquilla de replicación y su posible consecuencia biológica.

cierto nivel el enrollamiento hace inviable la separación de las cadenas por la helicasa. Por lo tanto, para que la enzima no sea frenada, es necesario compensar ese superenrollamiento con un desenrollamiento equivalente, a fin de prevenir excesivas tensiones torsionales en el segmento no replicado de la doble hélice.

El desenrollamiento es llevado a cabo por dos enzimas específicas, la *topoisomerasa I* y la *girasa* (o *topoisomerasa II*). Ambas, utilizando energía provista por el ATP, remueven cada una de las vueltas en exceso mediante un mecanismo que se cumple en tres pasos. Comencemos por la topoisomerasa I: primero corta una de las cadenas de la doble hélice; luego la cadena cortada gira una vuelta en torno de su propio eje; finalmente los extremos cortados se vuelven a unir. La girasa, en

cambio, en el primer paso no corta una sino las dos cadenas del ADN, las cuales, luego de girar una vuelta alrededor del eje de la doble hélice, restablecen sus uniones. Así, ambas enzimas primero se comportan como *nucleasas* (cortan al ADN a nivel de las uniones fosfodiéster) y luego como *ligasas* (reconectan las piezas cortadas, después de haber rotado el ADN). La girasa es una de las proteínas que integra el andamiaje proteico en el que se sostienen los lazos de cromatina de 30 nm (cap. 10-9). Se asocia con el ADN de cada lazo colocándose cerca de sus extremos, donde compone una suerte de articulación giratoria, como se muestra en la figura 14-15.

La topoisomerasa I y la girasa se diferencian no sólo porque la primera corta una de las cadenas del ADN y la segunda corta las dos, sino además por

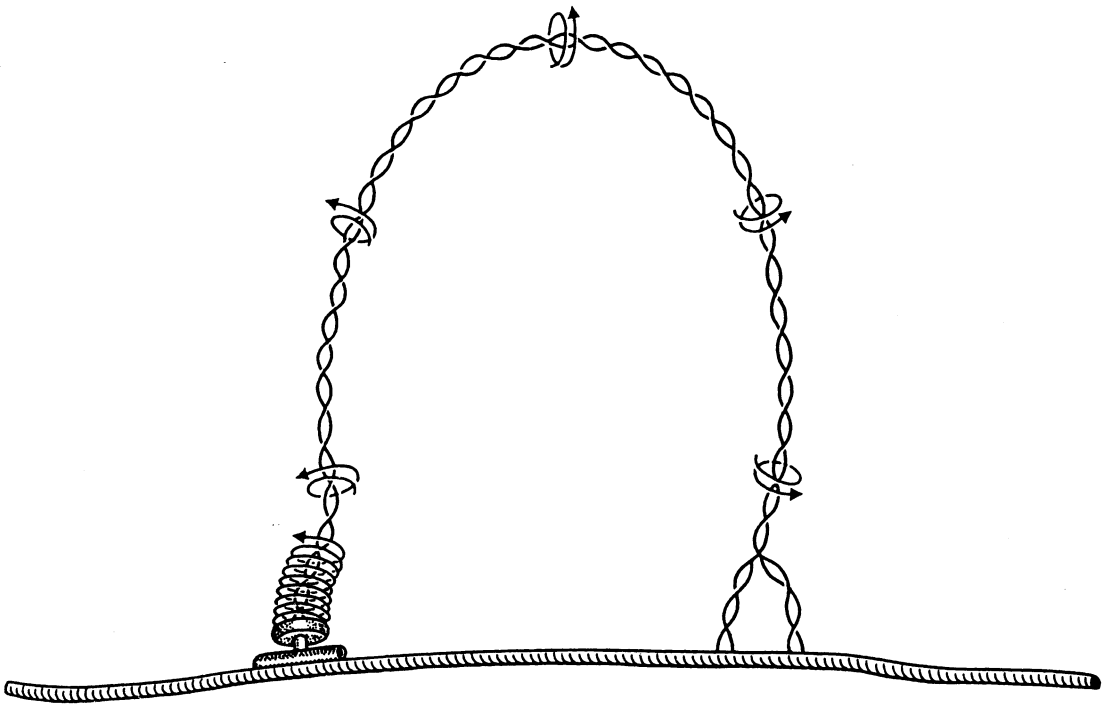


FIG. 14-15. Efecto hipotético de la topoisomerasa II (girasa) para evitar el superenrollamiento que se produce en el ADN como consecuencia de la separación progresiva de sus dos cadenas.

sus efectos, ya que el desenrollamiento del ADN producido por la topoisomerasa I es de corto alcance y el conseguido por la girasa abarca una extensión de ADN bastante mayor.

Por otra parte, no se descarta que estas enzimas sirvan para prevenir posibles enredos en las moléculas de cromatina fuera de la replicación, ya que —recurriendo a una analogía imperfecta— pueden actuar como tijeras y manos que para desenredar un hilo extenso y enmarañado lo cortan primero y lo anudan después.

14-11. Durante la transcripción interviene la topoisomerasa I

Es oportuno señalar que en la separación local de las dos cadenas del ADN que tiene lugar durante la *transcripción* —al avanzar la burbuja y con ella la copia de una de las cadenas— se produce, por delante de la ARN polimerasa, un superenrollamiento análogo al de la replicación. En este caso la tensión torsional es aliviada sólo por la *topoisomerasa I*.

14-12. La compactación de la cromatina retrasa la replicación

Por sus mecanismos de acción, la topoisomerasa I y la girasa no son responsables del desenrollamiento de los distintos grados de compactación de la cromatina causados por la asociación del ADN con las histonas. En el capítulo 12-12 se han analizado algunos mecanismos por medio de los cuales, durante la transcripción, la ARN polimerasa sorteaba parte de esa compactación. Hasta el momento no existen datos ciertos acerca de mecanismos similares que puedan actuar durante la replicación. A pesar de ello, no hay dudas de que la compactación del ADN afecta la replicación, ya que la *heterocromatina*, a diferencia de la *euromatina*,

se replica muy tardíamente en la fase S. Tal diferencia puede apreciarse cuando se compara el fin de la replicación del cromosoma X activo con el de su homólogo compactado (cuerpo de Barr); en éste es bastante más tardío a pesar de que las secuencias de los nucleótidos en ambos cromosomas son virtualmente idénticas. Por otro lado, también hay diferencias en los tiempos de replicación cuando se compara el ADN situado en las *bandas R* (ricas en nucleótidos apareados G-C) con el ADN que compone las *bandas G y Q* (ricas en nucleótidos apareados A-T) (fig. 10-15). Así, las bandas R se replican durante la primera mitad de la fase S y las bandas G y Q lo hacen durante la segunda mitad. El significado de estas bandas ha sido analizado en el capítulo 10-13.

14-13. Como el ADN, las histonas también se sintetizan en la fase S

Hemos advertido que el ADN se replica semiconservadoramente, es decir, que las cadenas de la doble hélice progenitora, al separarse para su replicación, se reparten por igual en ambos cromosomas hijos (cap. 14-2) (fig. 14-5). En cambio, no se sabe cómo se segregan las *histonas*. Es posible que al cabo de la replicación sean heredadas totalmente por uno de los cromosomas hijos, caso en el cual el otro cromosoma hijo debe proveerse de histonas sintetizadas recientemente. En su mayor parte las nuevas histonas se sintetizan en la fase S y se incorporan al cromosoma apenas su ADN es formado (fig. 14-16).

Casi todas las copias —entre 20 y 50— de los genes correspondientes a cada una de las cinco histonas son transcritas simultáneamente. Durante la fase S las concentraciones de los ARNm de las cinco histonas se mantienen considerablemente altas en el citosol, no sólo porque se incrementa su síntesis sino también porque disminuye su degra-

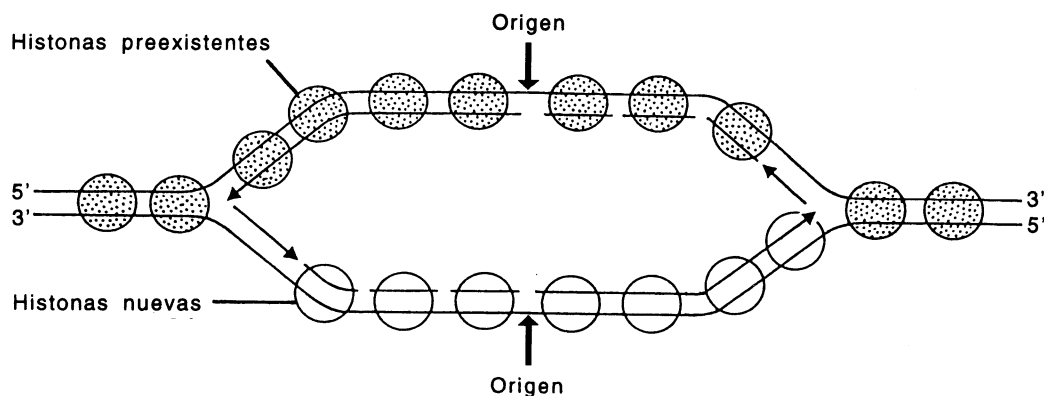


FIG. 14-16. Agregado de nuevas histonas durante la replicación del ADN.

dación (cap. 13-19). La pequeña cantidad de histonas que se sintetiza fuera de la fase S sería usada para reemplazar —en ambas cadenas del ADN— a las histonas envejecidas, aunque en general estas proteínas son bastante longevas, ya que suelen mantenerse durante toda la vida de la célula.

Como señalamos al comienzo del capítulo, al concluir la replicación los cromosomas contienen una doble dotación de ADN y las moléculas gemelas —es decir, las cromátidas— permanecen unidas por el centrómero. La replicación del ADN constituye el prólogo de la división celular, de manera que parte de lo analizado en este capítulo habrá de retomarse en el próximo, dedicado a la mitosis y su control.

MUTACION DEL ADN

14-14. La alteración del ADN puede llevar a mutaciones génicas o a aberraciones cromosómicas

El material genético se halla en constante peligro de ser alterado no sólo por la acción de diversos agentes ambientales, sino también espontáneamente, por ejemplo, como consecuencia de errores durante la replicación. Cuando las alteraciones del genoma involucran a uno o a unos pocos nucleótidos se denominan *mutaciones génicas*. Otras veces las alteraciones son de tal magnitud que afectan al propio cariotipo, motivo por el cual adquieren el nombre de *aberraciones cromosómicas*. Estas aberraciones pueden ser *estructurales* o *numéricas*. En las estructurales son afectadas partes extensas de uno de los cromosomas, que pueden perderse (delección) o sufrir una inversión, una duplicación o una translocación. En las numéricas, en cambio, el cariotipo exhibe un número mayor o menor de cromosomas. En este capítulo nos ocuparemos exclusivamente de las mutaciones génicas, postergándose hasta el capítulo 17 el análisis de las aberraciones cromosómicas.

14-15. Las mutaciones génicas tienen diversas consecuencias

Las mutaciones génicas más comunes consisten en la *sustitución* de un nucleótido por otro, en la *pérdida* (delección) de uno o varios nucleótidos, o en la *inserción* (intercalación) de uno o varios nucleótidos en la molécula de ADN. Cualquiera que sea el tipo de mutación, genera un cambio en la información contenida en el gen y lleva a la producción de una proteína distinta de la esperada o a su falta de producción. Como se sabe, el cambio de un nucleótido en un gen da lugar a un codón diferente y, en consecuencia, a la presencia en la

proteína de un aminoácido que no corresponde (salvo que el nuevo codón sea “sinónimo” y, por lo tanto, codifique al mismo aminoácido). Muchas veces el cambio de un solo aminoácido en una molécula proteica produce alteraciones sustanciales en sus funciones, ya que al modificarse su estructura primaria se alteran también sus estructuras secundaria y terciaria. La delección o la intercalación de un nucleótido en un gen modifica el “encuadre” de los codones en el ARNm desde el sitio de la mutación hasta el codón terminal (cap. 13-3). Ello suele traducirse en la producción de una proteína aberrante o, más comúnmente, en la interrupción de su síntesis, al aparecer un codón de terminación antes del lugar que corresponde.

Las mutaciones pueden producirse en las células *somáticas* o en las *germinativas*. En el primer caso, si bien pueden afectar el fenotipo de los individuos, no pasan a la descendencia. En cambio, cuando se instauran en las células germinativas suelen transmitirse a la descendencia de generación en generación.

Para los individuos las mutaciones suelen ser perjudiciales. En efecto, cuando corresponden a proteínas involucradas en la morfogénesis, las mutaciones se traducen en *malformaciones congénitas anatómicas*. Otras veces las proteínas modificadas dan lugar a *alteraciones funcionales* o a *trastornos metabólicos* (como ejemplos de las primeras pueden mencionarse las hemoglobinopatías, en las que la presencia en la hemoglobina de un solo aminoácido inadecuado suele generar graves disfunciones sanguíneas). En los trastornos metabólicos se alteran enzimas que participan en distintos procesos metabólicos de la célula. Las mutaciones también pueden afectar a genes imprescindibles para la supervivencia de las células o a genes involucrados en el control de la multiplicación celular; en el último caso suele descontrolarse la proliferación de las células, con la consiguiente aparición de *cuadros cancerígenos* (caps. 15-29 a 15-31). Consideradas desde el punto de vista biológico general, las mutaciones génicas tienen un lado positivo, ya que al acumularse en el genoma forjan a veces las condiciones para la creación de individuos mejor adaptados al medio ambiente, base de la evolución de las especies.

14-16. Existen diferentes tipos de mutaciones génicas espontáneas

La mayor parte de las mutaciones génicas que afectan a las células se producen espontáneamente *durante la replicación* del ADN. Ello se debe a que mientras se sintetizan las cadenas hijas suelen insertarse nucleótidos incorrectos, o nucleótidos de menos o de más. Como se verá en próximas sec-

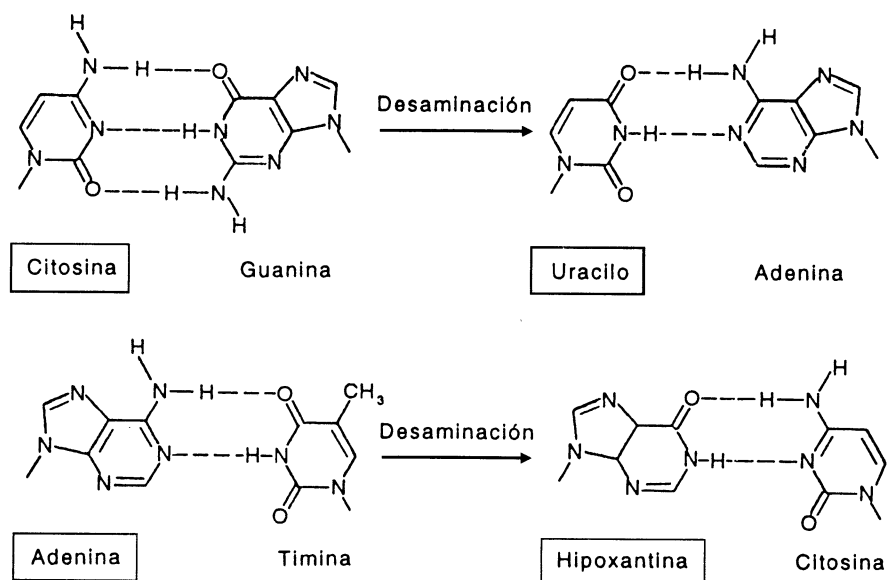


FIG. 14-17. Mutaciones génicas espontáneas producidas por desaminación.

ciones, la célula ha desarrollado mecanismos especiales para corregir tales errores y así lograr la mayor fidelidad posible en la duplicación del ADN. Esos mecanismos eliminan el 99,9% de los errores producidos durante la replicación, de modo que, de los numerosísimos nucleótidos incorrectamente insertados cada vez que se copian los millones de pares de nucleótidos en el genoma humano, en promedio persisten errados sólo tres.

Existen otras clases de mutaciones génicas espontáneas, *no vinculadas con la replicación* del ADN. Una de ellas —producida como consecuencia de un proceso llamado *desaminación*— deriva de la facilidad que tienen las bases de algunos nucleótidos para perder sus grupos amino. Como muestra la figura 14-17, cuando la citosina se desamina se convierte en uracilo, que se aparea con la adenina y no con la guanina. Si la célula no corrigiera el error, reemplazando el uracilo por una citosina, en la próxima replicación, al asumir la cadena hija alterada el rol de cadena progenitora, haría que se inserte una adenina en lugar de una guanina, lo cual consolidaría la mutación. Algo análogo ocurre —espontáneamente también— cuando se desamina la adenina, que al convertirse en hipoxantina se aparea con la citosina en vez de la timina.

Otra clase de mutación génica espontánea —llamada *apurinización*— se produce cuando una purina se desprende de su desoxirribosa, de modo que el nucleótido afectado pierde su base (fig. 14-18). Como consecuencia, queda en el gen un punto llamado *sitio AP* (por “*apurínico*”), sin información a pesar de no haberse cortado el ADN.

14-17. Varios agentes ambientales inducen la aparición de mutaciones génicas

Existen tres grupos de *agentes ambientales* que al actuar sobre las células inducen la aparición de mutaciones: 1) los *químicos*, que son los más difundidos; 2) las *radiaciones ionizantes*, por ejemplo, la radiación ultravioleta de la luz solar, los rayos γ y los rayos X, y 3) ciertos *virus* capaces de introducir piezas de ADN foráneo en los genes.

Algunos de estos agentes incrementan la aparición de las mutaciones que se dan espontáneamente (sustituciones de bases, deleciones, intercalaciones, desaminaciones, apurinizaciones), mientras que otros generan en el ADN otras clases de cambios. Así, tanto los rayos γ como los rayos X producen roturas en el ADN. Por su lado, la luz ultravioleta desencadena la formación, en una de las cadenas de la doble hélice, de varios tipos de dímeros entre

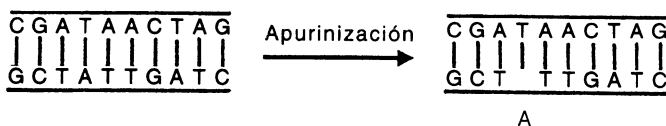


FIG. 14-18. Mutación génica espontánea producida por apurinización.

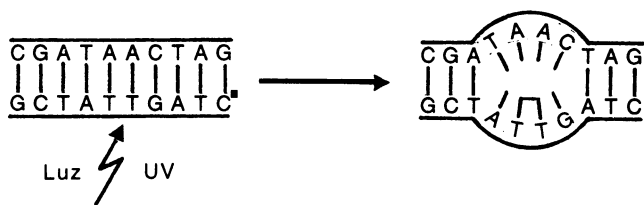


FIG. 14-19. Formación de dímeros de timina por acción de la luz ultravioleta.

pirimidinas adyacentes, de los cuales los más comunes son los *dímeros de timina* (fig. 14-19); la unión covalente entre dos timinas vecinas distorsiona su apareamiento con las adeninas de la cadena opuesta, lo cual, al interferir la replicación normal del ADN, conduce a la aparición de mutaciones.

REPARACION DEL ADN

14-18. Existen varios mecanismos para reparar al ADN

Para cada tipo de alteración del ADN existe un mecanismo de *reparación* particular, dirigido por un conjunto de enzimas específicas. A continuación analizaremos los mecanismos correctores de errores en el ADN más frecuentes. En la mayoría de los casos se basan en la información genética complementaria existente entre las dos cadenas del ADN, de modo que si una de ellas sufre alguna alteración (mutación), puede ser reparada a partir de la información normal contenida en la otra cadena. Como en todo proceso biológico, los mecanismos reparadores de errores en el ADN pueden fallar, de ahí la aparición de mutaciones génicas.

14-19. La ADN polimerasa corrige los errores que ella misma comete durante la replicación

Durante la replicación del ADN, para que un nucleótido pueda ser agregado en el extremo 3' de la cadena hija en crecimiento, es imprescindible que el nucleótido incorporado precedentemente sea el adecuado, ya que si la *ADN polimerasa* inserta en forma accidental un nucleótido incorrecto, "percibe" el error y no agrega nuevos nucleótidos, lo cual detiene transitoriamente el crecimiento de la cadena. El error es resuelto por la propia enzima mediante el ejercicio de una propiedad adicional que posee, conocida como "*lectura de pruebas*". Así, la ADN polimerasa, ante la presencia de un nucleótido incorrectamente insertado, retrocede y lo elimina, utilizando la actividad *exonucleolítica* 3'→5' de una de sus subunidades. Luego, una vez eliminado el nucleótido, la síntesis del ADN progresa normalmente. Como vemos, durante la replicación la ADN polimerasa controla y resuelve los

errores que ella misma comete. Sin embargo, dada la importancia de la integridad del ADN, si fallara esta "*lectura de pruebas*" se pone en marcha un *segundo sistema de reparación*, que se cumple en tres pasos.

14-20. Existe un segundo sistema de reparación a cargo de una nucleasa reparadora

Primeramente, el o los nucleótidos erróneos son removidos por una *nucleasa reparadora* —la misma que remueve a los cebadores en la síntesis continua y discontinua del ADN—, para lo cual la nucleasa corta las uniones fosfodiéster donde se ligan los nucleótidos correctos con los incorrectos. A continuación, el espacio que queda vacío es llenado por los nucleótidos adecuados mediante una reacción conducida por la *ADN polimerasa β*. El proceso se completa cuando la *ADN ligasa* conecta el extremo 3' del nuevo ADN con el extremo 5' del ADN cortado. Debe existir alguna señal que le permita a la nucleasa reparadora distinguir en cuál de las dos cadenas del ADN se encuentra el nucleótido incorrecto. En los procariotas, tal reconocimiento se basaría en una diferencia transitoria en la metilación de ciertas adeninas de las dos cadenas, ya que transcurre un tiempo entre la síntesis de la cadena hija y esa metilación, y los errores serían reparados durante ese período.

14-21. Las desaminaciones y apurinizaciones generan sitios AP

Fuera de la replicación, la aparición en el ADN de uracilos en lugar de citosinas —como consecuencia de *desaminaciones* espontáneas— desencadena un mecanismo de reparación distinto, que utiliza una *ADN glicosilasa* específica. Esta reconoce y corta la conexión química entre la base errónea y la desoxirribosa ligada a ella, de modo que deja al nucleótido sin su base (fig. 14-20). En forma similar, otra ADN glicosilasa específica remueve las hipoxantinas surgidas al desaminarse las adeninas. Cada desoxirribosa sin base o *sitio AP* (en este caso, por "*apurínico*" o por "*apirimidínico*") es reconocida, y por lo tanto removida, por dos enzimas que actúan en forma sucesiva. En primer término interviene una *AP endonucleasa*, que corta el extremo

5' del sitio AP. Luego lo hace una *fosfodiesterasa*, que al cortar el extremo 3' de ese sitio remueve la desoxirribosa del ADN. A continuación, la *ADN polimerasa* β coloca el nucleótido correcto en el lugar vacío y la *ADN ligasa* pone fin a la reparación.

Los sitios AP *apurínicos* que se producen al perderse alguna purina en forma directa (sección 14-16) son reconocidos —y reparados— por las mismas enzimas correctoras de los sitios AP surgidos tras las desaminaciones.

14-22. Dos nucleasas intervienen en la reparación de los dímeros de timina generados por la luz ultravioleta

La mayor parte de las mutaciones inducidas por agentes ambientales son reparadas por los mismos mecanismos que se utilizan en la corrección de las mutaciones espontáneas. En cambio, los *dímeros de timina* —generados, como dijimos, por la luz ultravioleta— son removidos por un sistema de enzimas especiales que hidrolizan simultáneamente dos uniones fosfodiéster, una a cada lado de la lesión. Así, luego de reconocer la distorsión provocada por la presencia del dímero, sendas *nucleasas* cortan en la cadena afectada la quinta y la vigesimocuarta unión fosfodiéster, contadas a partir del dímero en dirección 3' y 5', respectivamente. A continuación, el segmento de 29 nucleótidos —que obviamente incluye al dímero— es separado de la cadena normal por la *ADN helicasa*, que al cortar los puentes de H entre los nucleótidos de ambas cadenas libera a ese segmento del ADN. La reparación se completa cuando el lugar vacío es rellenado con la ayuda de una *ADN polimerasa*, y el extremo 5' del nuevo ADN es ligado por la *ADN ligasa*.

Una deficiencia de la nucleasa que remueve los dímeros de timina —presente en individuos homocigóticos que poseen el gen de esa nucleasa mutado— da lugar a una enfermedad llamada *xero-*

derma pigmentoso, caracterizada por una extrema sensibilidad de la piel a los rayos ultravioleta de la luz solar, causante de una alta incidencia de cáncer cutáneo tras cortas exposiciones a esas radiaciones.

TRANSPOSICION DE SECUENCIAS DE ADN

14-23. Los transposones son segmentos de ADN que saltan de un lugar a otro en el genoma

Durante muchos años se creyó en la existencia de una estabilidad absoluta en la distribución lineal de las secuencias de nucleótidos —y, en consecuencia, de los propios genes— en los cromosomas. Sin embargo, para ciertos tramos de ADN esto no es cierto. A fines de la década del 40 Barbara McClintock descubrió segmentos de ADN que tienen la propiedad de pasar de un lugar a otro del genoma. Estudió cepas de maíz cuyas mazorcas tienen granos de colores diferentes; basándose en observaciones citogenéticas, propuso que los granos de color claro eran producidos por segmentos de ADN que cambiaron de posición en el genoma, lo cual provocó la inactivación del gen para el grano pigmentado. Su hipótesis fue recibida con total descreimiento por los científicos y se la ignoró durante 20 años, hasta que se hicieron observaciones equivalentes en la *Escherichia coli*.

Luego se vio que estos elementos transponibles —o *transposones*— son capaces de codificar una proteína llamada *transposasa*, y que en sus extremos exhiben secuencias de nucleótidos repetidas si se las lee en direcciones opuestas. El número de nucleótidos en las secuencias repetidas es fijo para cada transposón. En el transposón hipotético ilustrado en la figura 14-21 se observa el gen de la *transposasa* (que es una enzima de restricción) con las secuencias repetidas en sus flancos. La trans-

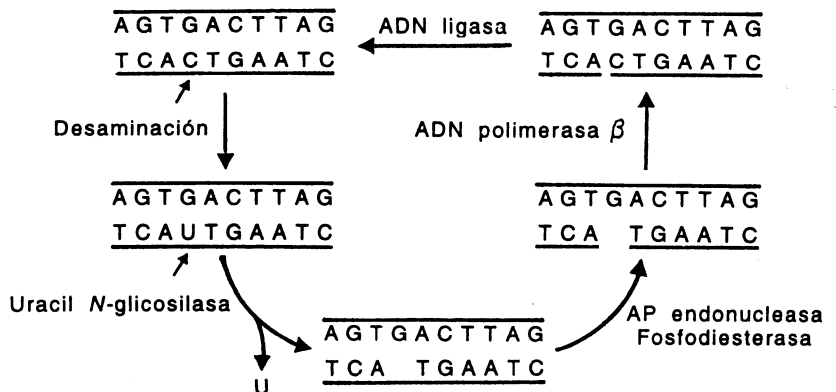


FIG. 14-20. Acción de un conjunto de enzimas durante la reparación del ADN mutado por desaminación.

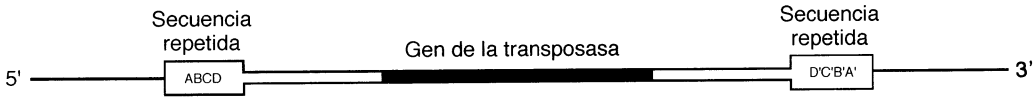


FIG. 14-21. Transposón con el correspondiente gen de la transposasa y las secuencias de nucleótidos repetidas inversamente en sus extremos.

posasa reconoce a esas secuencias en forma específica y ayuda a que se inserten en un sitio distinto del genoma.

Las secuencias repetidas presentes en los flancos del transposón son causa y consecuencia del mecanismo por el cual los transposones son extraídos de un lugar del genoma e insertados en otro. Como ilustra la figura 14-22, durante ese proceso la transposasa efectúa cortes espaciados, inserta al transposón y realiza las reparaciones necesarias en el ADN.

Los transposones tienen gran similitud con los virus que contienen ARN, llamados *retrovirus*. En el ciclo de los retrovirus la información genética contenida en el ARN es copiada en sentido retrógrado (ARN→ADN) por la enzima *transcriptasa inversa*, y el ADN resultante es insertado en el genoma de las células infectadas. Las semejanzas son tan amplias que los retrovirus pueden ser considerados como transposones especializados que aprendieron a saltar de una célula eucariota a otra.

En la mosca *Drosophila melanogaster* la mayor parte del ADN repetitivo está representado por unas 15 familias de elementos transponibles. Existen en el genoma entre 20 y 80 copias de cada familia. Se sabe que estas secuencias tienden a saltar de un lado a otro del genoma porque en las distintas cepas de moscas los transposones se hallan localizados en los cromosomas en posiciones diferentes. La mayoría de las mutaciones espontáneas en la *Drosophila* son causadas por transposones que saltan dentro de un mismo gen. La primera mutante detectada —una mosca de ojos blancos— resultó tener un elemento transponible insertado en medio del gen que codifica la enzima que determina el color rojo del ojo.

En el hombre el elemento transponible más abundante corresponde al ADN repetitivo de la familia *Alu* (cap. 10-7), cuyas secuencias constitu-

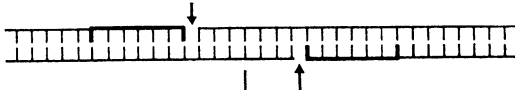
yen el 3 al 6% del genoma humano. El traspaso de secuencias *Alu* puede tener derivaciones importantes. Por ejemplo, se sabe que se producen deleciones (cap. 17-10) en regiones no esenciales de ADN flanqueadas por secuencias *Alu*, de modo que la recombinación entre secuencias *Alu* en medio de determinados intrones puede llevar a la creación de genes nuevos. De la misma manera, segmentos de ADN flanqueados por secuencias *Alu* pueden ser movilizados e insertados en otras posiciones en el genoma. Como únicamente el 10% del ADN de los mamíferos codifica ARN que da lugar a proteínas, el 90% restante podría tolerar deleciones e inserciones sin ninguna consecuencia genética.

Otro mecanismo capaz de crear genes nuevos deriva de la transposición de exones, que al combinar sectores funcionales de dos genes preexistentes puede formar un nuevo gen (fig. 14-23). Como vemos, la flexibilidad genómica introducida por los elementos transponibles ha sido fundamental para la evolución. No obstante, la mayoría de los genes nuevos han aparecido por el mecanismo de duplicación genética (cap. 17-10) seguido por una mutación en la segunda copia del gen; esto es lo que ha ocurrido con los genes de las *globinas α* y *β*, que se formaron a partir de un gen ancestral común.

14-24. Las duplicaciones genéticas suelen producir pseudogenes

Muchos de los genes duplicados no se convierten en genes nuevos sino que dan lugar a los llamados *seudogenes*, incapaces de generar ARNm. Puesto que no sufren ningún tipo de presión selectiva, estos pseudogenes, relativamente frecuentes en el genoma de los mamíferos, acumulan mutaciones, lo que puede convertirlos en genes funcionales.

1. La transposasa hace cortes separados



2. La inserción y reparación genera duplicación



FIG. 14-22. Cortes espaciados en el ADN, efectuados por la transposasa, e inserción del transposón

14-25. Los seudogenes procesados se originan por la transcripción inversa de moléculas de ARN

El genoma también contiene seudogenes surgidos no por duplicación genética sino a partir de moléculas de ARN primero copiadas por la enzima transcriptasa inversa (sección 10-15) y luego insertadas en el genoma. En consecuencia, estos segmentos —que reciben el nombre de *seudogenes procesados*— podrían ser “marcas” dejadas en el ADN por la actividad de algunos retrovirus, halladas normalmente en las células de todos los mamíferos.

Los seudogenes procesados se hallan flanqueados por secuencias repetidas de ADN similares a las descritas en los transposones. La inactividad funcional de estos seudogenes se debe a que carecen de promotores. Se han encontrado seudogenes procesados con una composición molecular muy parecida a la de los genes de las inmunoglobulinas, de las globinas y de la tubulina β .

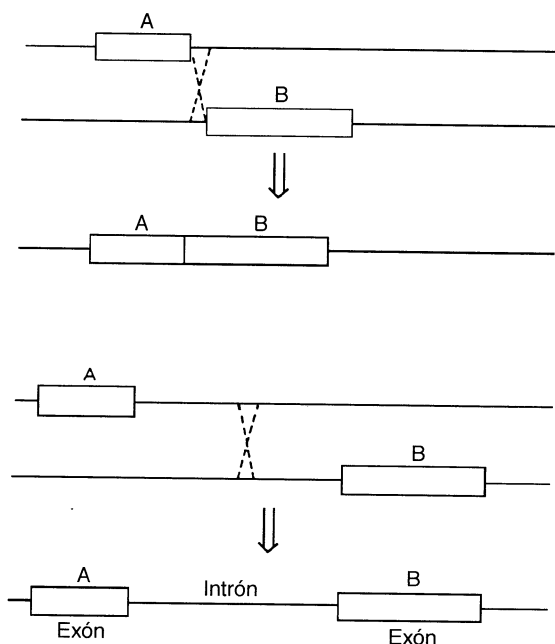


FIG. 14-23. Construcción de nuevos genes mediante la transposición de exones de genes preexistentes.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts B. and Sternglanz R. (1977) Recent excitement in the DNA replication problem. *Nature* 269:655.
- Bauer W. R., Crick F. H. C. and White J. H. (1980) Supercoiled DNA. *Sci Am.* 243 (1):118.
- Bramhill D. and Kornberg A. (1988) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* 54:915.
- Brenner S., Barnett L., Crick F. H. C. and Orgel A. (1961) The theory of mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 3:121.
- Brewer B. J. and Fangman W. L. (1987) The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* 51:463.
- Callan H. (1973) Replication of DNA in eukaryotic chromosomes. *Br. Med. Bull.* 29:192.
- Calos M. P. and Miller J. M. (1980) Transposable elements. *Cell* 20:579.
- Chase J. W. and Williams K. R. (1986) Single-stranded DNA binding protein required for DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 55:103.
- Cohen S. N. and Shapiro J. A. (1980) Transposable genetics elements. *Sci. Am.* 242:40.
- Cooper G. M. (1982) Cellular transforming genes. *Science* 217:801.
- Cozzarelli N. R. (1980) DNA gyrase ends the supercoiling of DNA. *Science* 207:953.
- DePamphilis M. L. and Wassarman P. M. (1980) Replication of eukaryotic chromosomes: a close-up of the replication fork. *Annu. Rev. Biochem.* 49:627.
- Drake J. W. (1970) *The Molecular Basis of Mutation*. Holden-Day, San Francisco.
- Drake J. W. (1991) Spontaneous mutation. *Annu. Rev. Genet.* 25:125.
- Gellert M. (1981) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 50:879.
- Gierl A. and Frey M. (1991) Eukaryotic transposable elements with short terminal inverted repeats. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2:698.
- Greider C. W. and Blackburn E. H. (1996) Telomeres, telomerase and cancer. *Sci. Am.* 274 (2):80.
- Grossman L., Caron P. R., Mazur S. J. and Oh E. Y. (1988) Repair of DNA-containing pyrimidine dimers. *FASEB J.* 2:2629.
- Harley C. B. and Villeponteau B. (1995) Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:249.
- Howard-Flanders P. (1981) Inducible repair of DNA. *Sci. Am.* 245 (5):72.
- Huberman J. A. and Riggs A. D. (1968) On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J. Mol. Biol.* 32:327.
- Huberman J. A. and Tsai A. (1973) Direction of DNA replication in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 75:5.
- Jackson V. (1988) Deposition of newly synthesized histones: hybrid nucleosomes are not tandemly arranged on daughter DNA strands. *Biochemistry* 27:2109.
- John P. C. L. (1981) *The Cell Cycle*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kaguni L. S. and Lehman I. R. (1988) Eukaryotic DNA polymerase-primase: structure, mechanism and function. *Biochem. Biophys. Acta* 950:87.
- Kerr R. A. (1994) New link found between p53 and DNA repair. *Science* 266:1321.
- Kornberg A. (1980) *DNA Replication*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Koshland D. E. Jr. (1994) Molecule of the year: The DNA repair enzyme. *Science* 266:1925.
- Laskey R. A. and Harland R. M. (1981) Replication origins in the eukaryotic chromosomes. *Cell* 24:283.
- Laskey R. A., Fairman M. P. and Blow J. J. (1989) S phase of the cell cycle. *Science* 246:609.
- Lingner J., Cooper J. and Cech T. P. (1995) Telomerase and DNA end replication: No longer a lagging strand problem? *Science* 269:1533.
- Loeb L. A. (1985) Apurinic sites as mutagenic intermediates. *Cell* 40:483.
- Lohman T. M. (1993) Helicase-catalyzed DNA unwinding. *J. Biol. Chem.* 268:2269.
- Marx J. (1994) Chromosome ends catch fire. *Science* 265:1656.
- Marx J. (1994) DNA repair comes into its own. *Science* 266:728.

- Ogawa T. and Okazaki T. (1980) Discontinuous DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 49:421.
- Prelich G. and Stillman B. (1988) Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 replication in vitro requires PCNA. *Cell* 53:117.
- Prescott D. M. (1976) Reproduction of Eukaryotic Cells. Academic Press, New York.
- Rubin G. M. and Spradling A. C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218:348.
- Russev G. and Hancock R. (1982) Assembly of new histones into nucleosomes and their distribution in replicating chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79:3143.
- Sancar A. and Sancar G. B. (1988) DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 57:29.
- Seachrist L. (1995) Telomeres draw a crowd at Toronto Cancer Meeting. *Science* 268:29.
- Shapiro J. A. (1983) Mobile Genetic Elements. Academic Press, New York.
- Sharp P. A. (1983) Conversion of RNA to DNA in mammals: Alu-like elements and pseudogenes. *Nature* 301:471.
- Smith G. P. (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossing over. *Science* 191:528.
- Taylor J. H. (1958) The duplication of chromosomes. *Sci. Am.* 198 (6):36.
- Taylor J. H. (1974) Units of DNA replication in chromosomes of eukaryotes. *Int. Rev. Cytol.* 37:1.
- Walker G. C. (1985) Inducible DNA repair systems. *Annu. Rev. Biochem.* 54:425.
- Wang J. C. (1982) DNA topoisomerases. *Sci. Am.* 247 (1):94.
- Wang J. C. (1991) DNA topoisomerases: why so many? *J. Biol. Chem.* 266:533.
- Wevrick R. and Buchwald M. (1993) Mammalian DNA-repair genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:470.

15/ Mitosis. Control del ciclo celular

José Hib

MITOSIS

15-1. Un individuo adulto está formado por unas 10^{13} células

La capacidad de reproducirse es una propiedad fundamental de la célula. Se puede tener una idea de la magnitud de la reproducción celular si se considera que un individuo adulto está formado por billones de células (10^{13}), todas derivadas de una sola, el cigoto. La multiplicación celular sigue siendo notable aun en un ser adulto que ha dejado de crecer. Un ejemplo llamativo lo dan los eritrocitos, cuya vida media es de sólo 120 días. Así, el organismo debe producir unos 2,5 millones de eritrocitos por segundo para mantener su número relativamente constante. Esa reproducción celular debe ser regulada de manera perfecta para que la formación de nuevas células compense las pérdidas y se mantenga el equilibrio.

15-2. En el ciclo celular se intercalan períodos de interfase con divisiones celulares

Como adelantáramos en el capítulo 14-1, las células pasan por un ciclo que comprende dos períodos fundamentales: la *interfase* y la *división celular*. Esta última tiene lugar por *mitosis* o por *meiosis*. A causa de los profundos cambios que el microscopio óptico permitía observar, el período de división constituyó durante muchos años el punto de interés primordial para los citólogos, ya que la interfase fue considerada como una etapa de “reposo”, a pesar de ser el período en el que se lleva a cabo la actividad biosintética más alta del ciclo celular, tanto en el núcleo como en el citoplasma. La mayoría de las células pasa la parte más extensa de su vida en interfase, durante la cual duplican su tamaño y el contenido cromosómico. Debe señalarse que algunos tipos celulares diferenciados se

dividen rara vez, y que las células nerviosas, después del nacimiento, no se dividen en absoluto; así, en una neurona el período de interfase dura toda la vida de la persona.

El ciclo celular puede ser considerado como una compleja serie de fenómenos que culminan cuando el material celular se distribuye en las células hijas. La división celular es sólo la fase final y microscópicamente visible de cambios previos ocurridos a nivel molecular. Así, antes que la célula se divida por mitosis, sus principales componentes ya se han duplicado. En este aspecto, la división celular puede considerarse como la separación final de las unidades moleculares y estructurales previamente duplicadas.

15-3. La interfase comprende los períodos G1, S y G2

El uso de métodos citoquímicos brindó los primeros indicios de que la duplicación del ADN ocurre durante la interfase. Más adelante, la radioautografía con timidina marcada permitió determinar el período exacto en que se produce la duplicación del ADN, y demostró que la síntesis tiene lugar solamente durante un tramo limitado de la interfase, denominado período S o sintético, que es precedido y seguido por los períodos G1 y G2 (por gap, intervalo), en los que no hay síntesis de ADN. Esto llevó a dividir el ciclo celular en cuatro períodos sucesivos: G1, S, G2 y M (mitosis) (fig. 14-1). G2 es el tiempo que transcurre entre el final de la síntesis de ADN y el comienzo de la mitosis.

Durante G2 la célula contiene el doble ($4n$) de la cantidad de ADN presente en la célula diploide original ($2n$) (fig. 15-1). Después de la mitosis, las células hijas entran nuevamente en el período G1 y tienen un contenido de ADN equivalente a $2n$.

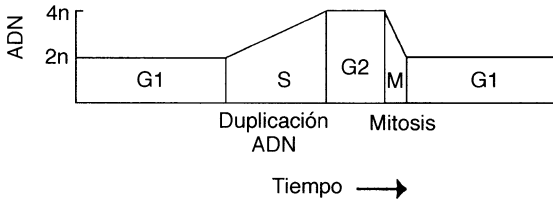


FIG. 15-1. Cambios en el contenido de ADN durante las distintas fases del ciclo vital de la célula. 2n, contenido diploide de ADN. 4n, contenido tetraploide de ADN.

15-4. G1 es el período más variable del ciclo celular

La duración del ciclo varía mucho de un tipo celular a otro. En una célula cultivada de mamífero, con un tiempo de vida generacional de 16 horas, la fase G1 dura 5 horas; la fase S, 7 horas; la fase G2, 3 horas, y la fase M, 1 hora (fig. 15-2). Los períodos S, G2 y M son relativamente constantes en la mayoría de los tipos celulares. El más variable es el período G1, que puede durar días, meses o años. Las células que no se dividen (como las nerviosas o las del músculo esquelético) o que se dividen poco (como los linfocitos) se hallan en el período G1, que en estos casos se denomina G0 porque las células se retiran del ciclo celular.

Antes dijimos que los diferentes períodos del ciclo celular se describieron sobre la base de experimentos radioautográficos. Una experiencia típica consiste en exponer células en cultivo a timidina-³H durante 10 minutos. Luego las células se lavan, se las coloca en un medio no marcado y se las fija a intervalos de una o dos horas durante 24 horas, haciendo en cada caso una autorradiografía. En tales condiciones, el porcentaje de células en mi-

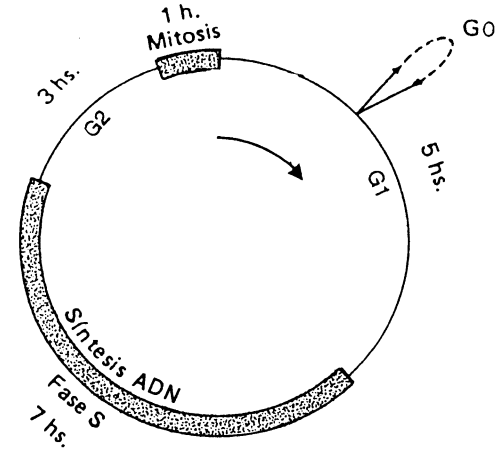


FIG. 15-2. El ciclo celular con la duración de cada una de sus fases, en una célula que se divide cada 16 horas.

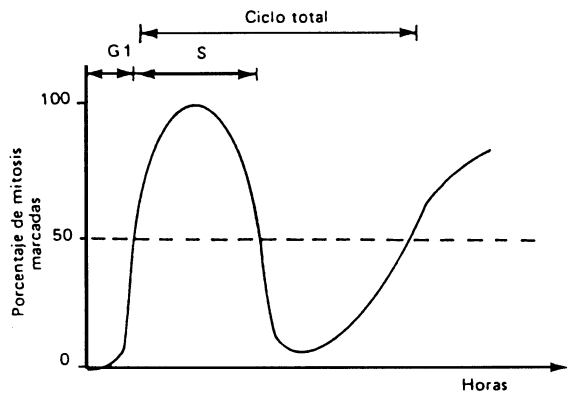


FIG. 15-3. Determinación de la duración de las fases del ciclo celular por el porcentaje de células mitóticas que se marcan después de un pulso con timidina-³H. La longitud de cada fase puede determinarse a partir de los puntos en que la curva corta la línea del 50%.

tosis que se marcan permite medir el ciclo celular (fig. 15-3). Los primeros cromosomas marcados aparecen a las 3 horas, lo cual indica que ésta es la duración de la fase G2. La fase S se extiende entre el tiempo en que aumenta el número de mitosis marcadas y el tiempo en que decrece. Este método es bastante engorroso. Hoy se usa un analizador de células activado por fluoresceína (contador de Coulter), que es un microfluorómetro. Así, pasando por una fina boquilla una suspensión de células tratadas con un colorante fluorescente que

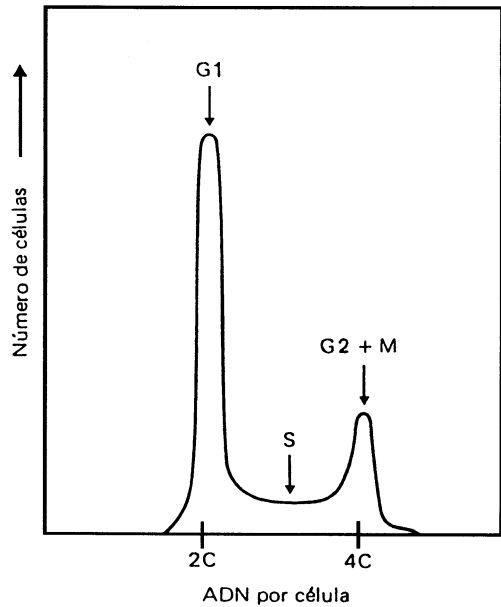


FIG. 15-4. Medida del contenido de ADN de células coloreadas con un marcador fluorescente.

se fija al ADN, puede medirse la intensidad de la fluorescencia de la célula. Como se aprecia en la figura 15-4, si se representa el análisis en un diagrama se puede calcular fácilmente la proporción de células que se hallan en los períodos G1, S y G2.

Los estudios sobre el ciclo celular se han visto facilitados por el uso de células sincronizadas, con el que se consiguen muchas células en una misma fase del ciclo. Existen diversos métodos para lograr la sincronización. El más sencillo es el de la selección mitótica de células cultivadas. Se basa en el hecho de que las células en mitosis se vuelven esféricas y se adhieren menos a la pared del frasco de cultivo, mientras que las interfásicas son aplanadas y se fijan con más fuerza. Agitando los cultivos es posible desprender las células en mitosis, dejando las interfásicas adheridas. De esta manera se puede obtener hasta un 99% de células en mitosis.

15-5. Descripción general de la mitosis

Dijimos que la división celular comprende una serie de fenómenos por los cuales los materiales primero se duplican y luego se reparten en proporciones virtualmente iguales entre las dos células hijas. Todos los componentes de la célula, no sólo los que están relacionados con la transmisión de la herencia genética, se duplican antes que la célula se divida por mitosis. En los capítulos respectivos se analizaron los mecanismos por los cuales se produce un aumento del número de algunos orgánulos (mitocondrias, peroxisomas) y el incremento del volumen de otros (retículo endoplasmático, complejo de Golgi, etc.). La mitosis comprende también el problema de la continuidad de los cromosomas como entidades capaces de autoduplicarse y de mantener sus características morfológicas a través de las sucesivas divisiones, de ahí que resulte necesario repasar los procesos vinculados con la replicación del ADN (cap. 14) y los que dan lugar al enrollamiento de la cromatina (cap. 10-9).

Entre los procesos que tienen lugar en el citoplasma, el más llamativo es la formación del *huso mitótico*, que se organiza cada vez que la célula comienza a dividirse y se desorganiza al final de la división. Veremos que funciona como un armazón estructural —compuesto por *microtúbulos*— y un sistema generador de fuerzas que controla la posición de los cromosomas y su distribución en las células hijas. En relación con este punto, corresponde recordar ciertas estructuras presentes en los cromosomas, como los *centrómeros*, ya que en ellos se implantan los microtúbulos del huso (cap. 10-6) (fig. 10-5). Como corolario de la mitosis se produce la partición del citoplasma y su distribución equitativa en las células hijas, fenómeno conocido con el nombre de *citocinesis*.

En general, los procesos que dan lugar a las mitosis son semejantes en todas las células del organismo. La figura 15-5 muestra las diferentes etapas de la mitosis, que son consideradas como fases de un ciclo que comienza al final de la interfase —o período intermitótico— y termina al iniciarse una nueva interfase. Las etapas en que se divide la mitosis son: *profase*, *prometáfase*, *metafase*, *anafase* y *telofase*. A partir de la penúltima comienza la *citocinesis* —o separación de los dos territorios citoplasmáticos—, que culmina apenas concluye la telofase. En primer término, las distintas fases de la mitosis serán consideradas de una manera eminentemente descriptiva, tratando de dar una idea global de los fenómenos que ocurren tanto en el núcleo como en el citoplasma. En secciones posteriores se pasará revista a la ultraestructura y a la bioquímica de algunos de esos fenómenos.

15-6. Durante la profase las cromátidas se condensan, se forma el huso mitótico y se desintegra el nucléolo

La detección de los cromosomas como filamentos delgados indica el comienzo de la *profase*. El término mitosis (del griego *mitos*, filamento) expresa este fenómeno, que se vuelve cada vez más evidente a medida que los cromosomas se siguen condensando por el enrollamiento de la cromatina. Como vimos en el capítulo 14-1, después de la duplicación del ADN en la fase S cada cromosoma está compuesto por dos moléculas de ADN, llamadas *cromátidas* (fig. 14-3). A medida que avanza la profase, las cromátidas se hacen más cortas y gruesas. Además, los *centrómeros* (o constricciones primarias) se vuelven claramente visibles, debido a que se les han asociado sendas placas proteicas —una a cada lado—, llamadas *cinetocoros* (fig. 15-8). Al principio los cromosomas están distribuidos homogéneamente en el interior del núcleo, pero luego se aproximan a la envoltura nuclear, de modo que aparece un espacio vacío en el centro del núcleo. Este movimiento centrífugo de los cromosomas indica que se aproxima el momento de la desintegración de la envoltura nuclear, y con ella el fin de la profase. También pueden observarse las constricciones secundarias de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. Otro cambio es la reducción del tamaño del *núcleolo*, que finalmente desaparece.

En el citoplasma, el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi se fragmentan en pequeñas vesículas. Como consecuencia de la desintegración del citoesqueleto, la célula pierde su forma original y se *hace esférica*. Además, según el tipo de célula, pierde sus contactos con las células vecinas o con la matriz extracelular. Pero lo que más se destaca en el citoplasma es la formación del *huso mitótico*.

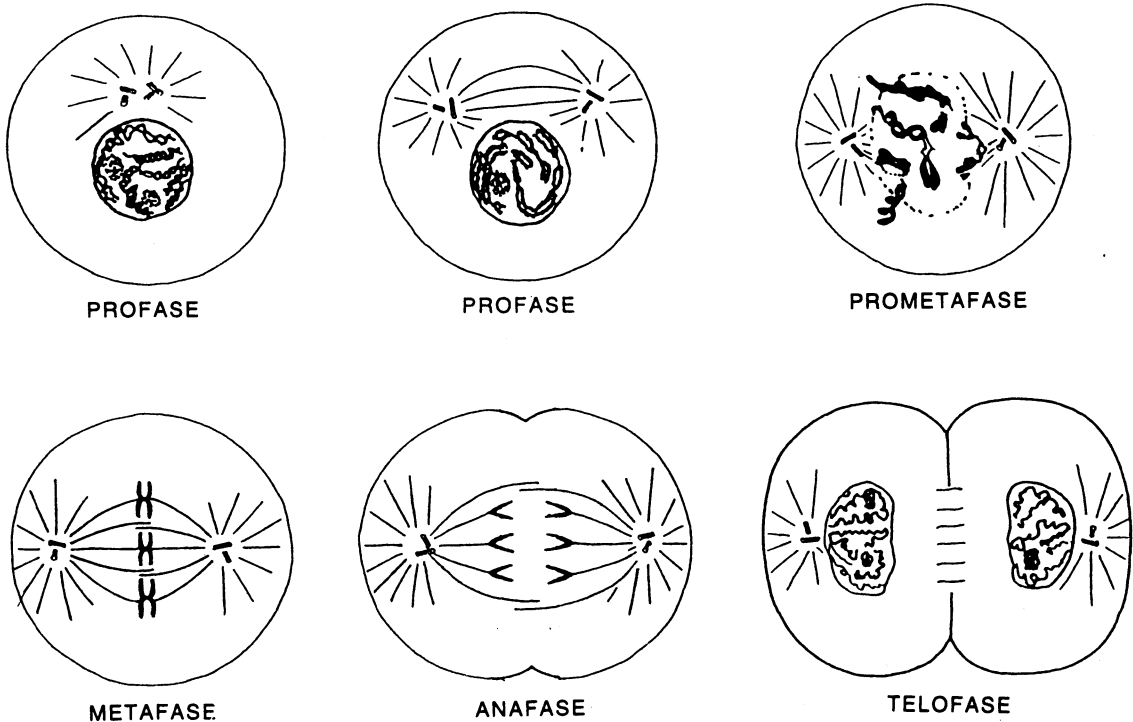


Fig. 15-5. Esquema general de la mitosis.

Trátase de dos conjuntos de haces de microtúbulos surgidos de sendos *centrosomas*, los cuales se alejan recíprocamente al dirigirse a los polos opuestos de la célula. Como se vio en el capítulo 5-16, el centrosoma está integrado por un par de *centríolos* (perpendiculares entre sí) y la matriz centrosómica o pericentriolar, que es el verdadero lugar de nacimiento de los microtúbulos. Más adelante describiremos cómo —y en qué fase del ciclo celular— la célula forma el segundo centrosoma. Desde los centrosomas, las fibras del huso irradian en todas las direcciones, pero las más llamativas son las que se extienden hacia el centro de la célula, donde sus tramos distales dan lugar a asociaciones de importancia funcional.

15-7. Durante la prometáfase se desintegra la envoltura nuclear

Lleva el nombre de *prometáfase* la transición entre la profase y la metafase. Se trata de un período muy corto, durante el cual se desintegra la *envoltura nuclear*, y los cromosomas —algo más condensados— quedan en aparente desorden. Los centrosomas ya arribaron a los polos de las células y las fibras del huso, desaparecida la envoltura nuclear, invaden el área del núcleo. Algunas de las fibras del huso se unen por sus puntas a los cinetocoros y por lo tanto —a través de los centrómeros— a los cromosomas; estas fibras se denominan

cinetocóricas. Otras fibras del huso —llamadas *polares*— se extienden más allá del plano ecuatorial y sus tramos distales se entrecruzan con sus similares provenientes del polo opuesto. Existe un tercer tipo de fibras surgidas de los centrosomas, que llevan el nombre de *fibras del áster*; son más cortas, irradian en todas direcciones y sus extremos se hallan aparentemente libres (fig. 15-6, A).

Volviendo a las fibras cinetocóricas, es lógico pensar que, al querer “captar” a los cromosomas, no se unan a sus centrómeros todas al mismo tiempo. Así, considerando a un cromosoma en particular, al unírsele primero las fibras que vienen de uno de los polos y después las provenientes del polo opuesto, presenta durante un tiempo movimientos de alejamiento y aproximación respecto del plano ecuatorial de la célula. Finalmente, cuando ambas fuerzas se equilibran, el cromosoma se sitúa y se mantiene en ese plano.

15-8. Durante la metafase los cromosomas se orientan en el plano ecuatorial de la célula

En la *metafase*, los cromosomas —que han llegado a su máxima condensación— aparecen ordenados en el *plano ecuatorial*. Se acomodan de modo tal que las dos placas cinetocóricas en cada centrómero quedan orientadas hacia los polos opuestos de la célula, “mirando” a los respectivos centrosomas (fig. 15-6, A).

15-9. Durante la anafase los cromosomas hijos se dirigen hacia los polos de la célula

Durante la *anafase* se produce la partición de los centrómeros, hecho que ocurre simultáneamente en todos los cromosomas (fig. 14-3). Las cromátidas —o *cromosomas hijos*— se separan y comienzan a migrar hacia los polos, traccionadas por las fibras cinetocóricas del huso. Los cromosomas suelen adoptar la forma de una V, de brazos iguales los metacéntricos, y desiguales los submetacéntricos y acrocéntricos (cap. 10-12). El centrómero, en el ángulo de la V, precede a las partes restantes del cromosoma en su “carrera” hacia el centrosoma. Como es obvio, en este proceso los microtúbulos de las fibras cinetocóricas se acortan progresivamente (fig. 15-6, B). En cambio, aumenta la longitud de los microtúbulos de las fibras polares, hecho que se da simultáneamente con el mutuo distanciamiento de los polos de la célula, que entonces pierde su forma esférica y adquiere un aspecto ovoide (fig. 15-6, C).

15-10. Durante la telofase se forman los núcleos hijos

La llegada de los cromosomas hijos a los polos —con la consiguiente desaparición de las fibras cinetocóricas del huso— señala el inicio de la *telofase*. La célula se ha alargado un poco más, de modo que las fibras polares exhiben una mayor longitud al ser comparadas con las de la anafase. Los cromosomas comienzan a desenrollarse; se muestran cada vez menos condensados, por lo que este proceso representa, en cierta forma, la recapitulación de lo sucedido en la profase, pero en sentido inverso.

Al tiempo que los cromosomas se convierten en fibras de cromatina, éstas son rodeadas por segmentos del retículo endoplasmático, los cuales se integran hasta formar las *envolturas nucleares* definitivas —con sus correspondientes poros nucleares— en torno de los dos núcleos hijos. Además, en ambos núcleos reaparecen los respectivos *núcleolos*.

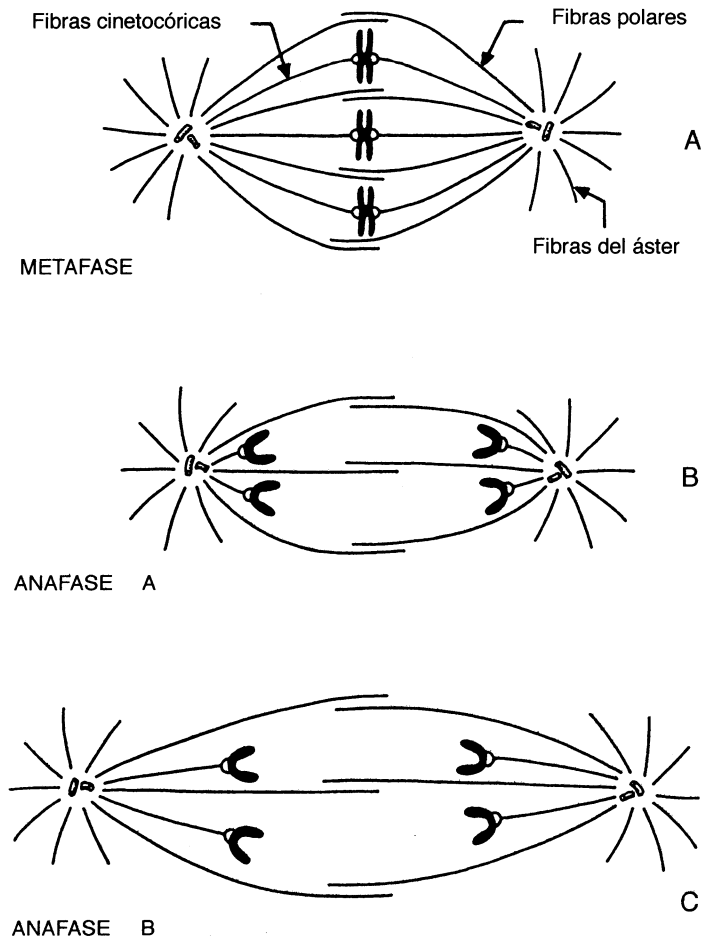


FIG. 15-6. Fibras del huso mitótico y su comportamiento durante la metafase (A), la anafase A (B) y la anafase B (C).

15-11. La citocinesis reparte el citoplasma entre las células hijas

La *citocinesis*, es decir, la partición del citoplasma, se inicia en la anafase. El citoplasma se constríe en la región ecuatorial por la formación de un *surco* en la superficie, que se acentúa y profundiza hasta que la célula se divide. Tanto las fibras del áster como las polares del huso se reducen hasta desaparecer. Solo sobreviven los tramos de las fibras polares ubicados a la altura de la zona ecuatorial de la célula, las cuales componen el llamado *cuerpo intermedio*, que analizaremos más adelante (fig. 15-10). Como es obvio, estas fibras quedan perpendiculares al surco que está dividiendo al citoplasma.

Se restablece el *citoesqueleto*, de modo que las células hijas readquieren la forma original de la célula predecesora. Dirigidos por el citoesqueleto, los componentes citoplasmáticos (mitocondrias, retículo endoplasmático, complejo de Golgi, etc.) se distribuyen en las células hijas como estaban en la célula madre.

15-12. El ciclo de los centrosomas comprende la duplicación de los centriolos y de la matriz centrosómica

Los *centrosomas* comienzan a duplicarse durante la interfase, más concretamente al final de la fase G1 o en el inicio de la fase S (fig. 15-7). En primer término, los dos *centriolos* del par centriolar se separan y cerca de cada uno aparece un *procentriolo*, dispuesto en ángulo recto con respecto al centriolo preexistente. Los *procentriolos* crecen lentamente durante las fases S y G2 y alcanzan su tamaño definitivo al comienzo de la profase, que exhibe dos pares de centriolos. Cada par de centriolos se halla en medio de su respectiva matriz centrosómica, proveniente de la *matriz centrosómica* original, que también se ha duplicado. Como

vemos, los centriolos no se duplican por división ni a partir de un molde. Más aún, los *procentriolos* surgen a cierta distancia de los centriolos predecesores (no están en contacto), los cuales actúan como sitios de inducción para la organización del material precursor que les da origen.

15-13. Los cinetocoros son los sitios de implantación de los microtúbulos

Como vimos, cada uno de los cromosomas está asociado a un par de estructuras especiales llamadas *cinetocoros*, en las cuales se implantan, por una de sus puntas, algunos de los microtúbulos del huso mitótico (fig. 15-8). Los cinetocoros están adosados al *centrómero* (constricción primaria), esto es, al segmento más estrecho del cromosoma. Así, el *centrómero* no sólo es el punto por el cual se mantienen unidas las cromátidas hermanas, sino además el lugar donde se produce —cinetocoros mediante— la conexión de los cromosomas con los microtúbulos del huso. El *centrómero* está compuesto por heterocromatina constitutiva que contiene ADN repetitivo satélite (caps. 10-7 y 10-11).

Los cinetocoros hermanos se ven mejor en la metafase. Están situados en los lados del *centrómero* correspondientes a las cromátidas, de modo que en la metafase cada uno “mira” hacia su respectivo polo celular. Con el microscopio electrónico, en un corte transversal, cada cinetocoro aparece como una estructura trilaminar que contiene un par de discos densos, de unos 50 nm de diámetro cada uno, y una zona intermedia más clara, de 25 nm de diámetro (fig. 15-8). Muestran dos caras: una externa, convexa, en la que se implantan 34 ± 5 microtúbulos, y otra interna, en contacto con la cromatina del *centrómero*. Se ha observado que fibras de cromatina surgidas de este último ingresan en el cinetocoro, lo atraviesan, salen por la cara externa y, tras doblarse, regresan al cromosoma. Aparentemente estas fibras son las que mantienen

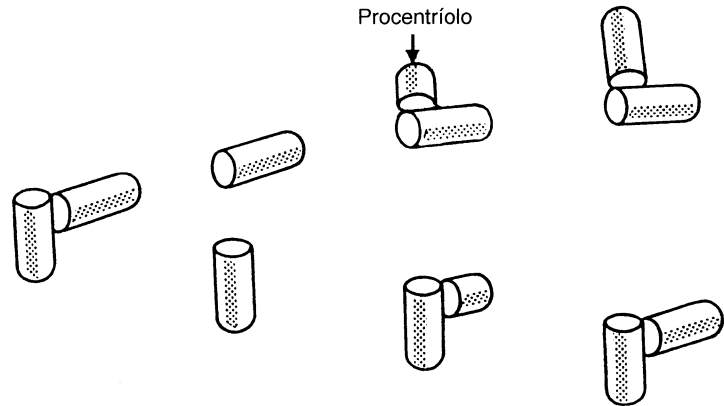


FIG. 15-7. Duplicación de los centriolos.

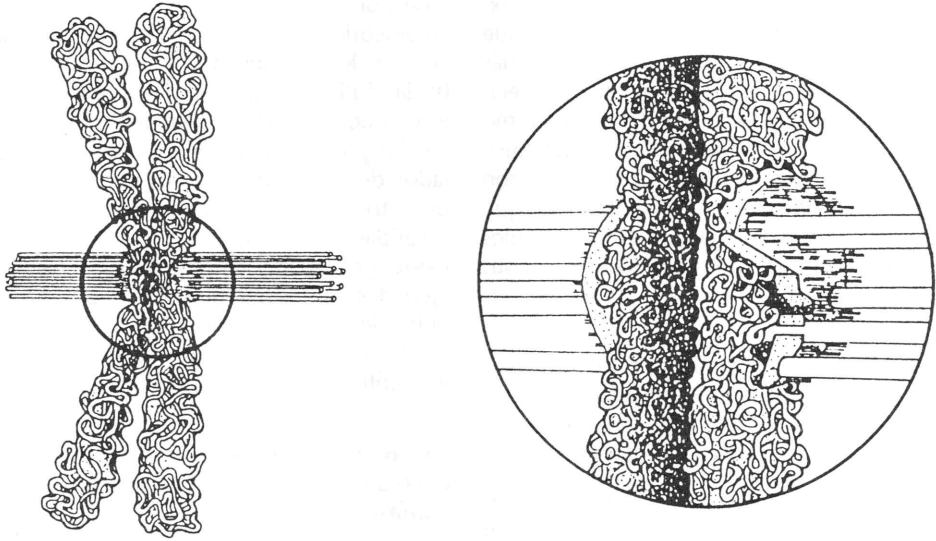


FIG. 15-8. Estructura del centrómero en un cromosoma metafásico. Se observan los cinetocoros, en los cuales se implantan los microtúbulos de las fibras cinetocóricas del huso mitótico.

a los cinetocoros ligados al centrómero. Más aún, los tramos que salen por la cara cinetocórica externa componen una especie de "corona", cuya presencia se vincularía con el anclaje de los microtúbulos en el cinetocoro. Más adelante analizaremos el papel que desempeñan los cinetocoros en la separación de los cromosomas hijos durante la anafase.

En la enfermedad humana denominada *esclerodermia* se generan autoanticuerpos denominados *CREST*, que reaccionan contra los cinetocoros. El uso de tales anticuerpos ha provisto al investigador de un excelente marcador para estudiar algunos de los componentes cinetocóricos. Así se han detectado las proteínas encargadas del anclaje de los discos cinetocóricos en la cromatina, otras que estabilizan la inserción de los microtúbulos y una proteína motora del tipo de la dineína. Los autoanticuerpos *CREST* permitieron observar a los cinetocoros no sólo durante la mitosis sino también en las restantes etapas del ciclo celular, en las que aparecen tantos cinetocoros como cromosomas poseen las células. Los cinetocoros comienzan a formarse aparentemente en la fase S.

Gracias a los autoanticuerpos *CREST* también se pudo determinar la localización y la secuencia de los genes que codifican a las proteínas cinetocóricas. Hállanse en los propios centrómeros, en medio del ADN repetitivo satélite que los caracteriza. Así, la heterocromatina de los centrómeros no sólo contiene ese ADN —que muestra la llamada *secuencia alfoide*, mencionada en el capítulo 10-7—, sino también los genes de las proteínas cinetocóricas. Además, como vimos, aporta las fibras que amarran

los cinetocoros al centrómero, cuyos extremos componen la corona en la que se hallan anclados los microtúbulos cinetocóricos provenientes de los polos celulares. En los cinetocoros de los cromosomas humanos se han identificado cinco proteínas, a las que se les ha dado el nombre de *cenp-A, B, C, D* y *E* (por *centromere protein*). La *cenp-B* se halla unida a la secuencia alfoide, de modo que estaría localizada no en el cinetocoro sino en la heterocromatina centromérica (a menos que la secuencia alfoide integre las fibras de cromatina que invaden el cinetocoro).

15-14. Los microtúbulos dan lugar a las fibras cinetocóricas, polares y del áster

En el citosol existe normalmente una abundante cantidad de monómeros de *tubulina* libres, que se encuentran en equilibrio dinámico con los de los *microtúbulos*, tanto en la interfase como en la mitosis. Cuando las células comienzan la profase, los microtúbulos interfásicos se despolimerizan y se construyen los del huso mitótico. Así, en la mitosis sólo existen microtúbulos pertenecientes al huso. En la anafase, con el desplazamiento de los cromosomas hacia los polos, el huso comienza a despolimerizarse, por lo menos sus fibras cinetocóricas. En la telofase lo hacen las restantes fibras cinetocóricas, las del áster y las polares, aunque estas últimas no en toda su extensión porque persisten los tramos pertenecientes al cuerpo intermedio (sección 15-20). Finalmente, estando todavía las células hijas unidas, comienzan a reaparecer los primeros microtúbulos interfásicos.

En el capítulo 5-10 se comentó que los dos extremos de los microtúbulos son diferentes, ya que en uno el crecimiento y el acortamiento son más rápidos (extremo *más* [+]) y en el otro el crecimiento y el acortamiento son más lentos (extremo *menos* [-]) (fig. 5-7). Los microtúbulos del huso mitótico poseen el mismo tipo de polaridad, con sus extremos [-] localizados en los centrosomas que les dan origen. En consecuencia, los microtúbulos cinetocóricos se insertan en los cinetocoros por sus extremos [+].

15-15. Las fuerzas generadas por los microtúbulos provocan el desplazamiento de los centrómeros en la profase, y de los cromosomas en la prometáfase y la metafase

Los microtúbulos son capaces de generar un tipo de fuerza mecánica —empuje o tracción— sobre los centrómeros y, por ende, sobre los cromosomas. El empuje y la tracción son consecuencia, respectivamente, del alargamiento y del acortamiento de los microtúbulos (fig. 15-6).

La migración de los centrosomas hacia los polos durante la profase se debe probablemente a que son empujados por el alargamiento de los microtúbulos tendidos entre los centrosomas. Dado que entre los tramos de los microtúbulos entrecruzados en la zona ecuatorial de la célula se ha detectado una proteína motora del tipo de la dineína (cap. 5-14), no se descarta que el deslizamiento de unos microtúbulos sobre otros sea un mecanismo adicional usado por la célula para trasladar a los centrosomas a los polos. En los fibroblastos, la separación de los centrosomas se realiza a una velocidad de 0,8 a 2,4 μm por minuto.

Tan pronto como comienza la desintegración de la envoltura del núcleo y la región nuclear es inva-

dida por los microtúbulos, las puntas de las fibras cinetocóricas establecen contacto con los cinetocoros y los cromosomas comienzan a trasladarse hacia el plano ecuatorial de la célula. Este traslado es consecuencia del alargamiento (en un lado de la célula) y del acortamiento simultáneo (en el otro lado) de microtúbulos provenientes de los polos opuestos, cosa que pueden hacer porque poseen polaridades contrapuestas. Durante la metafase existe una suerte de equilibrio entre las fuerzas ejercidas por los microtúbulos originados en ambos polos, lo cual mantiene a los cromosomas inmovilizados en el plano ecuatorial y por consiguiente a los centrómeros íntegros, sin escindirse.

15-16. Otros tipos de fuerzas generan el desplazamiento de los cromosomas en la anáfase

En la anáfase se rompe ese equilibrio, lo cual provoca la partición de los centrómeros y con ella la separación de las cromátidas hijas. Pronto los cromosomas comienzan a moverse hacia los polos, a una velocidad de 1 μm por minuto. La característica forma en V adoptada por los cromosomas sugiere que las fuerzas responsables de la tracción hacia los polos —como resultado del acortamiento de los microtúbulos cinetocóricos— son transmitidas a los cinetocoros. Más aún, previamente esas fuerzas fueron lo bastante intensas como para provocar la partición de los centrómeros.

La importancia de los microtúbulos en el traslado de los cromosomas durante la anáfase fue revelada por experimentos de micromanipulación. En uno de ellos se vio que el traslado no se altera cuando se extraen los centrosomas, lo cual sugiere que estas estructuras no son indispensables para ese movimiento y que la fuerza motriz se localizaría en el cinetocoro. Esta interpretación fue confirmada por otro experimento en el que se inactivó uno de los cinetocoros del centrómero durante la metafase mediante rayos láser (fig. 15-9). El resultado fue que los dos cromosomas hijos se dirigieron rápidamente al polo de la célula correspondiente al cinetocoro intacto. Para la interpretación de este resultado es necesario tener en cuenta que en el centrosoma se halla el extremo [-] de los microtúbulos (donde tiene lugar la despolimerización lenta de las tubulinas) y en el cinetocoro el extremo [+] (donde la despolimerización es rápida). El resultado avala la teoría de que la fuerza mecánica que tracciona a los cromosomas hacia los polos surge del acortamiento de los microtúbulos cinetocóricos.

Estos y otros experimentos han dado lugar a dos teorías para explicar el traslado de los cromosomas durante la anáfase: la del equilibrio dinámico y la del deslizamiento.

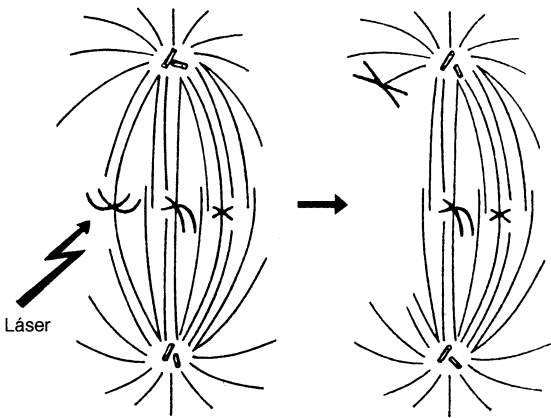


FIG. 15-9. Experimento en el cual se inactiva con rayos láser un cinetocoro metafásico. Los dos cromosomas hijos se mueven hacia el polo correspondiente al cinetocoro intacto. (De P. A. McNeill y M. W. Berns, 1981.)

La teoría del *equilibrio dinámico* sostiene que la despolimerización de los microtúbulos —en sus dos extremos— es la responsable exclusiva del traslado; así, la fuerza mecánica derivada del desarme de los microtúbulos bastaría para trasladar a los cromosomas. La teoría del *deslizamiento*, aunque reconoce la despolimerización de los microtúbulos, considera que éstos se comportan como “rieles” sobre los cuales los cromosomas se desplazan mediante proteínas del tipo de la dineína, presentes en los discos cinetocóricos.

15-17. El alargamiento de la célula en la anafase genera un mecanismo adicional para el traslado de los cromosomas hacia los polos

El traslado de los cromosomas en la anafase comprende dos procesos distintos pero concurrentes, los cuales han dado lugar a la división de este período en las llamadas anafase A y anafase B. Durante la *anafase A*, el traslado de los cromosomas hacia los polos corresponde a los movimientos descritos en la sección anterior, asociados a los microtúbulos cinetocóricos. En cambio, en la *anafase B* se produce el mutuo alejamiento de los dos conjuntos cromosómicos como consecuencia del alargamiento que experimenta la célula, por lo que está vinculado al crecimiento de los microtúbulos de las fibras polares (fig. 15-6, C). Entre los tramos entrecruzados de estas fibras —en la zona ecuatorial de la célula— existe una proteína motora del tipo de la dineína, mencionada en la sección anterior; así, es posible que el deslizamiento de algunos microtúbulos sobre otros constituya un recurso complementario usado durante el alargamiento de la célula para “empujar” a los cromosomas hacia los polos.

15-18. La envoltura nuclear es reconstituida durante la telofase

En el capítulo 10 (dedicado al núcleo interfásico) estudiamos la *envoltura nuclear* (con sus dos membranas asociadas al retículo endoplasmático),

la *lámina nuclear* (constituida por los filamentos intermedios llamados *láminas*) y los *complejos del poro*. Al finalizar la profase, la envoltura nuclear se desintegra en vesículas (que se confundirán con las del retículo endoplasmático), la lámina nuclear se desarma (por la despolimerización de las láminas) y los complejos del poro quedan ligados a algunos cromosomas. Al arribar la célula a la telofase, partes del retículo endoplasmático se asocian a los cromosomas y se fusionan entre sí hasta reconstituir las envolturas de los núcleos hijos. Además, al tiempo que reaparecen los complejos del poro, las láminas se polimerizan y recomponen la lámina nuclear.

15-19. Durante la mitosis se interrumpe la síntesis de ARN

La síntesis de ARN se detiene en la mitosis. Así, la velocidad de la síntesis declina rápidamente en la profase tardía, para desaparecer en la metafase y la anafase. Es que, tal como ocurre durante la interfase en algunos sectores del ADN, la cromatina no puede ser transcripta cuando se halla muy enrollada porque es imposible que la ARN polimerasa llegue al ADN (cap. 12-12). También la síntesis proteica (a partir de moléculas de ARN formadas con anterioridad) disminuye drásticamente en la mitosis, casi al 25% de la que tiene lugar durante la interfase. Ambas actividades sintéticas —la del ARN y la de las proteínas— comienzan a recuperarse en la telofase, al desenrollarse la cromatina y recomponerse la envoltura nuclear.

15-20. La citocinesis se genera al formarse un anillo contráctil compuesto por actina y miosina II

Aunque en la telofase los microtúbulos del huso tienden a despolimerizarse y desaparecer, las fibras polares persisten en la zona ecuatorial de la célula, donde incluso aumenta su cantidad. Estas fibras remanentes del huso mitótico, junto con vesículas y material denso que se les asocian, componen una estructura llamada *cuerpo intermedio* (fig. 15-10).

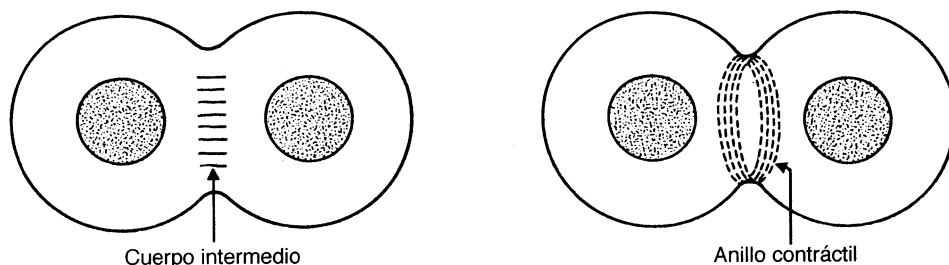


FIG. 15-10. Citocinesis. Se han dibujado por separado el cuerpo intermedio y el anillo contráctil, aunque ambas estructuras aparecen simultáneamente.

La citocinesis —o clivaje celular— se produce por la formación de un surco en el plano ecuatorial de la célula, a partir de la segunda mitad de la anafase (fig. 15-5). En la telofase, el surco ecuatorial se profundiza hasta alcanzar al cuerpo intermedio,

lo cual indica que en poco tiempo más se completará la partición del citoplasma (fig. 15-11).

El desarrollo del surco ecuatorial es el resultado de la formación de un *anillo contráctil* en la corteza de la célula, que consiste en un haz de unos 20

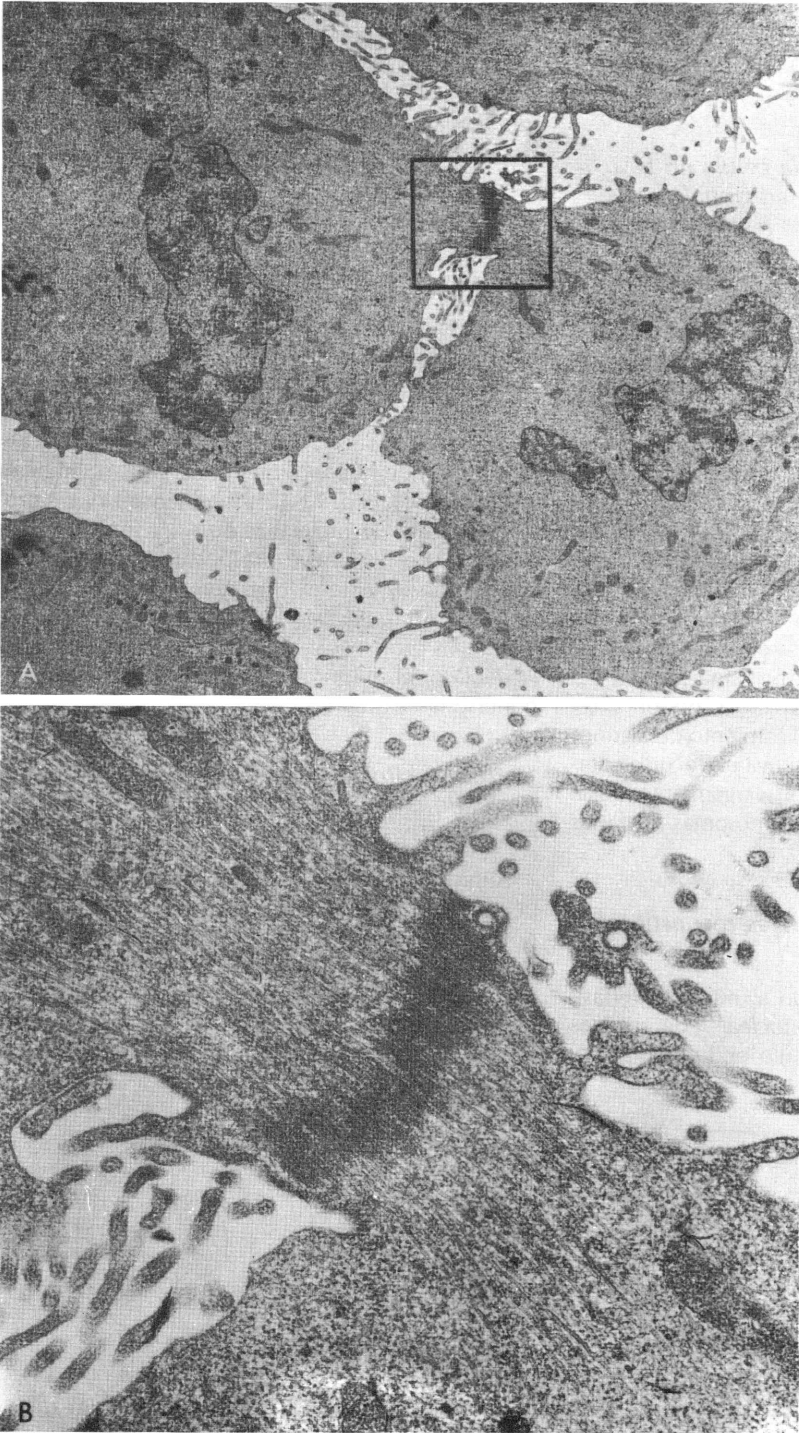


FIG. 15-11. Micrografía electrónica de una célula al final de la citocinesis. Ambas células hijas se encuentran todavía unidas por un pequeño puente que contiene los microtúbulos del cuerpo intermedio, que es electrónicamente denso. 10.000× y 30.000×. (Cortesía de B. R. Brinkley.)

filamentos de actina circunferenciales situados justo por debajo de la membrana plasmática, perpendiculares a los microtúbulos del cuerpo intermedio. Estos filamentos se deslizan unos sobre otros por la presencia de proteínas motoras del tipo de la *miosina II*. Dado que a medida que se reduce el diámetro del anillo no aumenta de grosor, debe existir una pérdida gradual y equivalente de monómeros en los filamentos de actina. El lugar donde se arma el anillo contráctil sería determinado —al finalizar la anafase— por los microtúbulos del áster, cuyos extremos libres, trasladados al ecuador de la célula, inducirían la polimerización circunferencial de los monómeros de actina.

CONTROL DEL CICLO CELULAR

15-21. Existen mecanismos que controlan la dinámica de los ciclos celulares

Las células se reproducen para hacer posible el crecimiento corporal y para reemplazar a las células que desaparecen por envejecimiento o por muerte programada (cap. 18-28); también lo hacen durante ciertas situaciones patológicas, como la reparación de heridas. Para poder reproducirse, la célula duplica primero el contenido de su núcleo y de su citoplasma y luego se divide en dos.

La multiplicación celular aparece apenas se inicia la vida embrionaria, con la segmentación de la célula huevo. Dado el enorme volumen del citoplasma de esta célula en relación con el tamaño del núcleo, durante las rápidas divisiones de segmentación sólo se duplican sus materiales nucleares, en tanto que los citoplasmáticos se reparten entre las sucesivas células hijas hasta lograrse el restablecimiento en el blastocisto de la relación nucleocitoplasmática característica de las células somáticas (cap. 18-7).

En la sección dedicada a la mitosis describimos el ciclo celular, y en el capítulo 14 vimos que el ADN y las moléculas nucleares que lo acompañan se duplican durante la fase S del ciclo. Por su lado, la duplicación de los componentes citoplasmáticos abarca las fases G1, S y G2.

Las células poseen mecanismos especiales tanto para coordinar los procesos de síntesis en el núcleo y en el citoplasma como para marcar el comienzo y la conclusión de las distintas fases del ciclo celular. Las próximas secciones del presente capítulo están destinadas al estudio de tales mecanismos.

15-22. En el control del ciclo celular intervienen las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas

Poco antes de finalizar la fase G1 —cuya duración varía bastante entre los distintos tipos celulares— existe un momento de transición en el que la célula debe tomar (o no) la decisión de dividirse. Ese momento del ciclo recibe el nombre de *punto de control G1* (o *de arranque*) (fig. 15-12). Más adelante veremos que la decisión es tomada ante la presencia de sustancias inductoras provenientes de otras células.

En el control de las divisiones celulares intervienen dos tipos de moléculas: 1) las *ciclinas*, cuyo nombre se debe a que en el curso de cada ciclo celular alternan un período de síntesis creciente seguido por otro de rápida degradación, y 2) las *quinasas dependientes de ciclinas*, que al ser activadas por las ciclinas fosforilan a moléculas cruciales para la división celular.

Existen varias clases de ciclinas, que se diferencian entre sí porque sus concentraciones suben y bajan en diferentes momentos del ciclo celular. Las principales corresponden a dos grandes grupos: las *ciclinas G1* y las *ciclinas mitóticas*. Por su parte, en

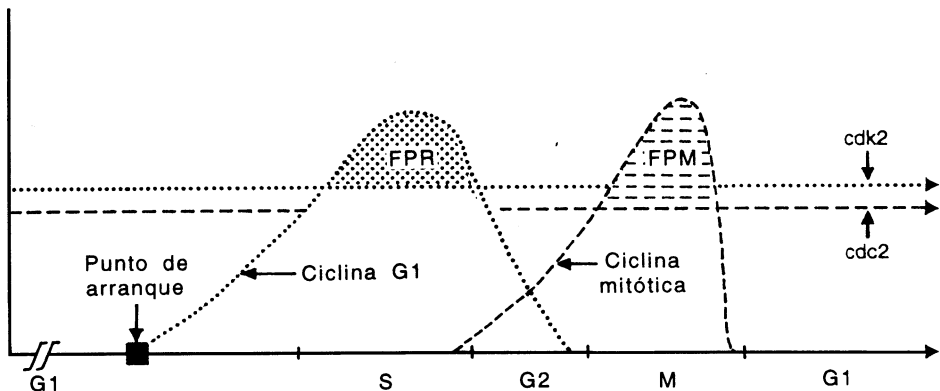


FIG. 15-12. En este diagrama se ilustran los cambios de concentración de las ciclinas G1 y mitótica durante el ciclo celular. La primera se asocia a la quinasa cdk2 para formar el factor promotor de la replicación (FPR), mientras que la segunda lo hace con la cdc2, con la cual forma el factor promotor de la mitosis (FPM).

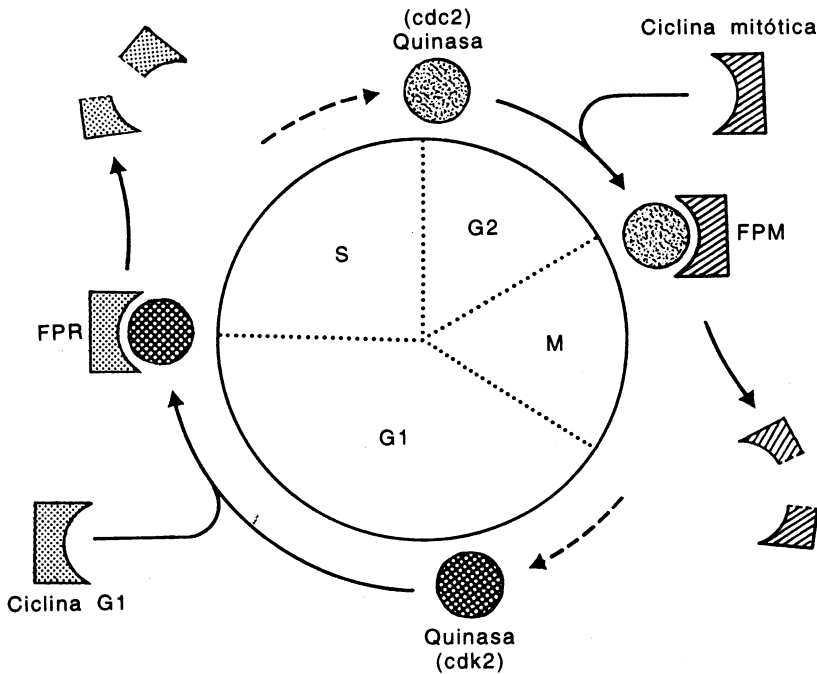


FIG. 15-13. Formación de los factores promotores de la replicación (FPR) y de la mitosis (FPM) durante el ciclo celular.

las células de especies superiores se han identificado dos quinasas dependientes de ciclinas, la *cdk2* (por *cyclin-dependent protein kinase*) y la llamada *cdc2* (por *cell-division cycle*). No obstante, la existencia en el genoma de una numerosa familia de genes relacionados con estas quinasas sugiere que, junto a la *cdk2* y la *cdc2*, podrían intervenir varias más en la regulación de los distintos pasos del ciclo celular.

15-23. La fase S se produce cuando la ciclina G1 activa a la *cdk2*

Tomada la decisión de dividirse, la célula deja atrás la fase G1 e ingresa en la fase S, es decir, comienza a replicar su ADN. Ello se debe a que una ciclina G1 activa a la quinasa *cdk2*, la cual inicia una cadena de fosforilaciones en sucesivas proteínas intermediarias, que culminan con la activación de algunas de las moléculas responsables de la replicación del ADN, por ejemplo, las ADN polimerasas.

La *cdk2* se activa sólo cuando la ciclina G1 alcanza determinado umbral de concentración, y éste es un requisito indispensable para que las dos proteínas puedan unirse (figs. 15-12 y 15-13). Más aún, a partir de ese momento ambas moléculas unidas componen un complejo proteico denominado *factor promotor de la replicación* (FPR). Dado que en un punto de la fase S la concentración de la ciclina comienza a declinar, cuando regresa al umbral anteriormente citado se separa de la *cdk2*,

por lo cual el FPR desaparece. Debe subrayarse que, de las dos moléculas, la ciclina es la única cuya concentración varía, ya que comienza a sintetizarse a partir del punto de control G1, sigue haciéndolo en proporciones cada vez más elevadas durante gran parte de la fase S, hasta que en un punto de esta última inicia su declinación para desaparecer por completo en el curso de la fase G2 (fig. 15-12). En cambio, los niveles de la *cdk2* se mantienen constantes a lo largo de todo el ciclo celular.

En una fase S normal, el ADN se replica solamente una vez, ya que si así no lo hiciese las células hijas tendrían un número anormal de cromosomas. En consecuencia, deben existir mecanismos para impedir la aparición de nuevas duplicaciones a partir del ADN ya replicado. Los cuadros que derivan de alteraciones en el control de este proceso serán analizados en el capítulo 17-8 bajo el nombre de *poliploidías*.

15-24. En la fase G2 actúan mecanismos de seguridad

La pausa impuesta por la fase G2 le provee a la célula un lapso durante el cual actúan determinados mecanismos de seguridad para controlar —antes que la célula se divida— si las moléculas de ADN han completado su replicación y, en los casos que corresponda, si fueron reparadas (cap. 14-18). Además, en la fase G2 debe completarse la duplicación de los componentes citoplasmáticos.

15-25. La fase M se produce cuando la ciclina mitótica activa a la cdc2

Superados tales controles, comienza la fase M. El mecanismo que desencadena la mitosis es similar al que inicia la fase S, aunque con distintos protagonistas. Ahora intervienen la cdc2 y una ciclina mitótica, que comienza a sintetizarse a partir de la fase G2 (antes que desaparezca la ciclina G1) (fig. 15-12). Cuando la ciclina alcanza un determinado umbral de concentración, se une a la cdc2; ambas componen un complejo denominado *factor promotor de la mitosis* (FPM) (fig. 15-13). Activada por la ciclina, la cdc2 fosforila —directamente o a través de moléculas intermediarias— a diversas proteínas que cumplen funciones esenciales en la consumación de la mitosis, por ejemplo, algunas proteínas asociadas a los filamentos de actina y a los microtúbulos del citoesqueleto, las láminas de la lámina nuclear, la histona H1, etc. Veamos las consecuencias de la fosforilación de estas proteínas:

1. Se desintegra el armazón de filamentos de actina, de modo que la célula pierde contacto con sus vecinas (o con la matriz extracelular) y se vuelve esférica. Más tarde, otros filamentos de actina participan en la citocinesis.
2. Se desarman los microtúbulos interfásicos, pero otros se nuclean para dar lugar a las fibras del huso mitótico.
3. Se disgrega la lámina nuclear y con ella la envoltura del núcleo.
4. Se modifica la forma como la histona H1 se asocia al ADN, lo que lleva al enrollamiento y compactación de los cromosomas.

Estos y otros fenómenos mitóticos se revierten al concluir la división celular, ya que las proteínas que los protagonizan se desfosforilan al desactivarse la cdc2, hecho que ocurre cuando la concentración de la ciclina mitótica cae a un nivel inferior al imprescindible para mantenerse unida a la quinasa.

La inactivación del FPM tiene lugar entre la metafase y la anafase, aunque se produce sólo si la totalidad de los cinetocoros se han ligado a los respectivos microtúbulos del huso mitótico; esto asegura la normal segregación de los cromosomas hacia los polos. Así, es posible que los cinetocoros no unidos a microtúbulos generen algún tipo de señal que detenga la caída de la ciclina mitótica —y en consecuencia la disgregación del FPM—, de modo que la célula no ingrese en la anafase.

15-26. Si la fase G1 es muy prolongada pasa a llamarse G0

Cada una de las células hijas surgidas de la mitosis ingresa en la fase G1 de la interfase y, si es inducida nuevamente por un factor estimulante de

la proliferación celular (sección 15-27), repite el ciclo seguido por la célula predecesora y se vuelve a dividir. En caso contrario, su fase G1 se prolonga y la célula “se retira” del ciclo, por lo que dicha fase pasa a llamarse G0 (fig. 15-2). Una situación diametralmente opuesta a ésta se da en las divisiones celulares que tienen lugar durante la segmentación del cigoto, en las que la fase G1 prácticamente no existe (tampoco la fase G2).

15-27. Diversas sustancias inducen la proliferación celular

El ritmo con que las células se reproducen depende de diversos factores, que varían en los distintos tipos celulares. Por ejemplo, las células que protagonizan la *segmentación de la célula huevo* parecen tener un mecanismo intrínseco que desencadena, en forma automática, una división apenas ha concluido la precedente. En cambio, las células que no se dividen permanecen en la fase G0 porque en sus citoplasmas no existen ciclinas ni quinasas dependientes de ciclinas, posiblemente por la presencia de factores que inhiben su producción.

En las células restantes, si bien el ritmo de reproducción varía de acuerdo con el carácter particular de cada tipo celular, depende de *sustancias inductoras* provenientes del exterior, sea de células vecinas (secreción paracrina) o de grupos celulares distantes (secreción endocrina). Como se vio en el capítulo 7, cada clase de inductor actúa sobre un receptor específico, a partir del cual su mensaje es conducido en el interior de la célula por una cadena de moléculas intermediarias cuyo último eslabón desata la respuesta esperada. Las sustancias inductoras de la proliferación celular actúan en el momento del ciclo llamado punto de control G1 (o de arranque), mencionado en la sección 15-22. El cambio que provocan da lugar al comienzo de la síntesis de las ciclinas G1 y —poco tiempo después— al inicio de la fase S.

Entre las moléculas orgánicas que actúan como inductoras de la multiplicación celular se encuentran:

1. La *somatomedina*, que estimula la proliferación de las células cartilaginosas durante el crecimiento óseo. Esta sustancia es sintetizada en el hígado, en respuesta a la hormona de crecimiento hipofisaria.

2. Varias clases de moléculas que llevan el nombre de *factores de crecimiento*, en su mayoría secretadas por células que se localizan en la vecindad de las células blanco (secreción paracrina). Así, los factores de crecimiento fibroblástico (FGF), epidérmico (EGF) y plaquetario (PDGF) estimulan la proliferación de muchos tipos celulares, no sólo los sugeridos por sus nombres. Otras moléculas, con

acciones más específicas, son los factores de crecimiento de los hepatocitos (HGF), de las neuronas (NGF) y del endotelio vascular (VEGF). En el capítulo 7 se describieron los receptores celulares para estos factores y el modo como sus señales son conducidas en el interior de las células.

3. Existen varias clases de *factores hemopoyéticos*, cada uno responsable de la proliferación de un tipo particular de célula sanguínea. Así, la interleuquina 2 (IL-2) estimula la multiplicación de los linfocitos T activados; el factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) hace lo propio con los elementos progenitores de estas células; etc. Finalmente, la *eritropoyetina*, originada en los riñones (secreción endocrina), es el factor hemopoyético encargado de estimular la proliferación de los glóbulos rojos en la médula ósea.

La secreción de las sustancias inductoras es regulada por mecanismos que tienden a mantener un número adecuado y más o menos constante de células de cada uno de los tipos celulares. Por ejemplo, la cantidad de eritropoyetina secretada por los riñones es proporcional a la destrucción de los glóbulos rojos en la sangre, y aumenta a niveles considerables en casos de hemorragias. Una situación similar se da durante la ablación parcial del hígado, en la que se secretan grandes cantidades de HGF, factor que provoca la rápida multiplicación de los hepatocitos próximos a la herida, hasta la recuperación del tamaño del órgano.

15-28. La proteína p53 controla el estado del ADN antes que la célula ingrese en la fase S

Las células responden a las sustancias inductoras —e ingresan en la fase S— una vez que sus moléculas de ADN han superado un control de calidad que tiene lugar en las postrimerías de la fase G1, antes del punto de arranque. Tal control es ejercido por una proteína citoplasmática llamada *p53* (su masa molecular es de 53 kDa), la cual es sintetizada por las propias células en respuesta a la aparición de alteraciones en el ADN. El gen que la codifica se llama *p53* y pertenece a la categoría de genes denominados supresores de tumores, por causas que veremos más adelante.

A su turno, la *p53* se comporta como un factor de transcripción que promueve la expresión de los genes de otras proteínas reguladoras —identificadas con las siglas *p21* y *p16*—, que tienen por misión bloquear la actividad enzimática de la *cdk2*. Ello genera un efecto opuesto al de las ciclinas G1, por lo que las células, al no replicarse sus moléculas de ADN, quedan estabilizadas en la fase G1. Finalmente, si se comprueba que el daño en esas mo-

léculas es peligroso para las futuras células hijas, la proteína *p53* ejerce una función adicional: provoca la muerte de la célula progenitora y con ella la desaparición de su ADN dañado (cap. 18-32).

En lo que atañe a la proteína *p21*, si no resultara suficiente para bloquear a la *cdk2*, le queda otro recurso para impedir la mitosis: cuando comienza la replicación del ADN se une al anillo de PCNA y anula sus funciones (cap. 14-7).

En las células existen otras proteínas reguladoras de la proliferación celular. Una de ellas —identificada con la sigla *Rb* (por el tumor de la retina llamado *retinoblastoma*)— deriva del gen *Rb*, que también es supresor de tumores. La *Rb* bloquea a algunos factores promotores de la replicación del ADN; se fosforila y desfosforila, actuando como “freno” de la replicación sólo cuando se halla fosforilada.

15-29. Muchos tipos de cánceres se producen por la acumulación de alteraciones genéticas

Si bien existe una lista de causas ambientales involucradas en la aparición de cuadros cancerígenos, desde hace bastante tiempo se sabe que entre los integrantes de algunas familias se presentan determinados tipos de cáncer con una incidencia muy alta, lo cual ha llevado a la investigación de las posibles bases genéticas de esta enfermedad. Así, se ha llegado al conocimiento de que el cáncer está ligado a alteraciones en ciertos genes llamados *protooncogenes* o a defectos en los genes denominados *supresores de tumores*. En el primer caso se acelera la proliferación celular, mientras que en el segundo se pierden sus frenos normales.

El cáncer no se genera a partir de células normales que se transforman en malignas en forma explosiva. Por lo contrario, surge después que sucesivas generaciones de células pasan por progresivos estados precancerosos como consecuencia de la acumulación de alteraciones genéticas en sus genomas, al cabo de las cuales la enfermedad se instala en un grupo de células descendientes.

En las células cancerígenas a menudo los cromosomas aparecen rotos o con partes translocadas, y algunos cromosomas suelen presentar no dos sino múltiples copias. Hoy se acepta que estos cambios no son consecuencia del desarrollo tumoral sino que se hallan asociados a sus causas.

15-30. Los protooncogenes son genes normales, y los oncogenes, sus versiones defectuosas

Los protooncogenes son genes normales que codifican proteínas comprometidas con el control de la proliferación celular. Hasta el momento se han

caracterizado aproximadamente cien, entre los cuales se encuentran los que codifican a las siguientes proteínas (los nombres de los genes figuran entre paréntesis):

1. Los factores de crecimiento PDGF (*sis*), EGF y M-CSF.

2. Los receptores membranosos para los factores de crecimiento PFGF, EGF (*erb-B*) y M-CSF (*fms*).

3. La proteína Ras (*ras*), algunas de cuyas tirosinas son fosforiladas por receptores con propiedades de tirosina quinasas.

4. La tirosina quinasa Src (*src*), que se activa por receptores membranosos exentos de esa actividad enzimática.

5. Otras tirosina quinasas, por ejemplo, las llamadas Fes (*fes*) y Abl (*abl*).

6. Varias serina-treonina quinasas, por ejemplo, la llamada Raf (*raf*), que es activada por la proteína Ras.

7. El receptor para la hormona tiroidea (*erb-A*), situado en el citosol.

8. Varias proteínas nucleares que actúan como factores de transcripción y están involucradas en la expresión de genes cuyos productos desempeñan un papel en la proliferación celular; por ejemplo, las proteínas llamadas Myc (*myc*), Myb (*myb*), Fos (*fos*) y Jun (*jun*).

El nombre de protooncogenes se debe a que sus versiones defectuosas son los llamados *oncogenes*, los cuales se diferencian de los protooncogenes porque se transcriben desmesuradamente —lo que da lugar a cantidades excesivas de sus productos— o generan productos aberrantes. En ambos casos la consecuencia es un aumento descontrolado de la proliferación celular.

Diversos virus son portadores de oncogenes. Hipotéticamente ingresaron en sus genomas siendo protooncogenes, cuando, en alguna remota ocasión, esos virus infectaron células de animales y se los “sustrajeron”; una vez instalados en el genoma viral, los protooncogenes se transformaron en oncogenes. Respaldada esta hipótesis el hecho de que en los virus los oncogenes no tienen ningún papel funcional. En la actualidad esos virus infectan a diversas especies animales, a las cuales les inyectan sus oncogenes y les provocan cuadros cancerígenos (por ejemplo, el *sarcoma de Rous* en los pollos, generado por el oncogén *src*).

Si bien algunos cánceres que afectan a la especie humana se hallan asociados con determinadas infecciones virales (por ejemplo, el virus de la *hepatitis B* aumenta la incidencia de carcinoma hepático, el *papilomavirus* incrementa la aparición de cáncer de cuello uterino, el virus del *sida* hace lo propio con el *sarcoma de Kaposi*, etc.), afortunadamente ninguno de los cánceres humanos es generado por oncogenes transferidos por virus. Así, la

presencia de oncogenes en las células cancerosas humanas se debe a la aparición de defectos en los propios protooncogenes, generados por alguno de los mecanismos que alteran al ADN, como mutaciones, translocaciones, duplicaciones, etc. (caps. 14-15 y 17-10).

Un solo alelo alterado en un protooncogén es suficiente para cambiar el fenotipo de una célula normal por uno de una célula cancerosa. Veamos algunos ejemplos de alteraciones de protooncogenes:

Se han observado mutaciones en el protooncogén *ras* en muchas clases de tumores, y se probó que este gen suele ser blanco de diversos carcinógenos, lo cual confirma el papel de su análogo alterado —el oncogén *ras*— en el desarrollo del cáncer. La sobreexpresión del oncogén genera grandes cantidades de proteína Ras, que al aumentar su concentración induce al siguiente eslabón de la cadena de señales responsable de la proliferación celular sin necesidad de ser estimulada por receptores activados.

En la *leucemia mieloide crónica*, el protooncogén *abl*, normalmente presente en el cromosoma 9, es translocado al cromosoma 22, donde se fusiona con un gen llamado *bcr* (cap. 17-17). Tal unión da lugar a una tirosina quinasa Abl híbrida, cuya actividad es manifiestamente mayor que la de la tirosina quinasa Abl normal.

En algunos *neuroblastomas*, el protooncogén *myc* suele estar amplificado unas 300 veces.

15-31. Los genes supresores de tumores previenen la multiplicación anormal de las células

Mientras que los productos de los protooncogenes promueven el crecimiento celular, los derivados de los *genes supresores de tumores* tienen por función bloquear la reproducción anormal de las células. Así, los defectos de los genes supresores de tumores —producidos por mutaciones génicas, deleciones o translocaciones—, al eliminar los frenos naturales que neutralizan la proliferación anormal de las células, generan cuadros cancerígenos.

A diferencia de lo que ocurre con los protooncogenes, los defectos en los genes supresores de tumores deben producirse en los dos alelos, ya que *son recesivos*. Hasta el momento se han caracterizado unos 10 genes supresores de tumores, entre los que se encuentran:

El ya nombrado *p53*, situado en el brazo corto del cromosoma 17. La mutación de ambas copias del gen *p53* —con la consiguiente ausencia de la proteína *p53*— desempeña un papel crucial en la génesis de muchos cánceres. Ello se debe a que este defecto conlleva un peligro adicional, pues las

células exentas de proteína p53, además de perder uno de los frenos naturales de la proliferación, acumulan errores en sus ADN (sección 15-19), lo cual propicia la aparición de muchos tipos de tumores.

Algo similar ocurre al alterarse ambos alelos del gen *Rb*, localizado en el brazo largo del cromosoma 13. En este caso, debido a la falta de proteína Rb, se produce un tumor maligno en la retina de los niños, aunque también se han detectado defectos del gen *Rb* en cánceres de muchos otros tejidos. Los defectos hallados en los dos alelos de este gen son variados, ya que pueden aparecer ambas copias mutadas, ambas ausentes (por delección), una mutada y una ausente, etcétera.

Otros ejemplos de genes supresores de tumores son el gen *MCC* (por *mutated in colon cancer*), perteneciente al brazo largo del cromosoma 5; el gen *DCC* (por *deleted in colon cancer*), ubicado en el brazo largo del cromosoma 18, y el gen *WT* (por *Wilms' tumor*), residente en el brazo corto del cromosoma 11.

BIBLIOGRAFIA

- Bailly E. and Bornens M. (1992) Centrosome and cell division. *Nature* 355:300.
- Bajer A. S. and Molé-Bajer J. (1972) Spindle dynamics and chromosome movements. In: *International Review of Cytology*. Academic Press, New York.
- Barinaga M. (1995) A new twist to the cell cycle. *Science* 269:631.
- Barnshaw W. C., Halligan N., Cooke C. and Rothfield N. (1984) The kinetochore is part of the metaphase chromosome scaffold. *J. Cell Biol.* 98:352.
- Beams H. W. and Kessel R. G. (1976) Cytokinesis. *Am. Sci.* 63:279.
- Bishop J. M. (1981) Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* 23:5.
- Bishop J. M. (1982) Oncogenes. *Sci. Am.* 246 (3):69.
- Bishop J. M. (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64:235.
- Cande W. Z., Lazarides E. and McIntosh R. (1977) A comparison of the distribution of actin and tubulin in the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 72:552.
- Cantley L. C. et al. (1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64:281.
- Cao L. G. and Wang Y. L. (1990) Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. II. Cortical movement of microinjected actin filaments. *J. Cell Biol.* 111:1905.
- Cavenee W. K. and White R. (1995) The genetic basis of cancer. *Sci. Am.* 272 (3):50.
- Cobrinik D. et al. (1992) The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *TIBS* 17:312.
- Cross F., Roberts J. and Weintraub H. (1989) Simple and complex cell cycles. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:341.
- Cross M. and Dexter T. M. (1991) Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell* 64:271.
- Culotta E. and Koshland D. E. Jr. (1993) p53 sweeps through cancer research. *Science* 262:1958.
- Dunphy W. G., Brizuela L., Beach D. and Newport J. (1988) The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MFP, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54:433.
- Fang F. and Newport J. W. (1991) Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 protein in higher eukaryotes. *Cell* 66:731.
- Fuller G. M. and Brinkley B. R. (1976) Structure and control of assembly of cytoplasmic microtubules in normal and transformed cells. *J. Supramol. Struct.* 5:497.
- Gerace L. and Blobel G. (1988) The nuclear lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19:277.
- Glotzer M., Murray A. W. and Kirschner M. W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349:132.
- Hartwell L. H. (1978) Cell division from a genetic perspective. *J. Cell Biol.* 77:627.
- Hartwell L. H. and Weinert T. A. (1989) Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629.
- Inoué S. (1981) Cell division and the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 91:3 Pt. 131s.
- John B. and Lewis K. R. (1969) The chromosome cycle. *Protoplasmatologia* 6b:1.
- Johnston L. H. (1990) Periodic events in the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2:274.
- Kirschner M. (1992) The cell cycle then and now. *TIBS* 17:281.
- Kubai D. F. (1975) The evolution of the mitotic spindle. *Int. Rev. Cytol.* 43:167.
- Li R., Hannon G. J., Beach D. and Stillman B. (1996) Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. *Curr. Biol.* 6:189.
- Lohka M. J., Hayes M. K. and Maller J. L. (1988) Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3009.
- Lu K. P. and Means A. R. (1993) Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocr. Rev.* 14:40.
- Lucocq J. M. and Warren G. (1987) Fragmentation and partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in HeLa cells. *EMBO J.* 6:3239.
- McIntosh J. R. (1984) Mechanism of mitosis. *Trends Biochem. Sci.* 9:195.
- McIntosh J. R. and Koonce M. P. (1989) Mitosis. *Science* 246:622.
- McIntosh J. R. and McDonald K. L. (1989) The mitotic spindle. *Sci. Am.* 261 (4):48.
- McNeill P. A. and Berns M. W. (1981) Chromosome behavior after laser microirradiation of a single kinetochore in mitotic PtK2 cells. *J. Cell Biol.* 88:543.
- Marx J. (1993) How p53 suppresses cell growth. *Science* 262:1644.
- Marx J. (1994) New tumor suppressor may rival p53. *Science* 264:344.
- Marx J. (1995) Cell cycle inhibitors may help brake growth as cells develop. *Science* 267:963.
- Massagué J. and Pandiella A. (1993) Membrane-anchored growth factors. *Annu. Rev. Biochem.* 62:515.
- Mazia D. (1974) The cell cycle. *Sci. Am.* 230 (1):54.
- Mazia D. (1987) The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. *Int. Rev. Cytol.* 100:49.
- Murray A. and Hunt T. (1993) *The Cell Cycle*. Oxford University Press, Oxford.
- Murray A. W. and Kirschner M. W. (1989) Dominoes and clocks: The union of two views of the cell cycle. *Science* 246:614.
- Murray A. W. and Kirschner M. W. (1989) Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 339:275.
- Murray A. W. and Kirschner M. W. (1991) What controls the cell cycle? *Sci. Am.* 264 (3):56.
- Murray A. W., Solomon M. J. and Kirschner M. W. (1989) The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 339:280.
- Murray A. W. and Szostak J. W. (1985) Chromosome segregation in mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1:289.
- Nicklas R. B. (1977) Chromosome movement, facts and hypotheses. In: *Mitosis, Facts and Questions*. Springer-Verlag, Berlin.
- Nicklas R. B. (1983) Measurement of the force produced by the mitotic spindle in anaphase. *J. Cell Biol.* 97:542.
- Nigg E. A. (1993) Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:187.

- Nislow C., Lombillo V. A., Kuriyama R. and McIntosh J. R. (1992) A plus-end-directed motor enzyme that moves antiparallel microtubules in vitro localizes to the interzone of mitotic spindles. *Nature* 359:543.
- Nurse P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344:503.
- Pardee A. B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246:603.
- Paweletz N. (1981) Membranes in the mitotic apparatus. *Cell Biol. Int. Rep.* 5:323.
- Perry M. E. and Levine A. J. (1993) Tumor suppressor p53 and the cell cycle. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 3:50.
- Peter M. et al. (1990) In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61:591.
- Pickett-Heaps J. D., Tippit D. H. and Porter K. R. (1982) Re-thinking Mitosis. *Cell* 29:729.
- Porter K. R. (1976) Motility in cells. In: *Cell Motility*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Prescott D. M. (1976) *Reproduction of Eukaryotic Cells*. Academic Press, New York.
- Ridley A. J. (1995) Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:24.
- Rosenblatt J., Gu Y. and Morgan D. O. (1992) Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2824.
- Rowley J. D. (1983) Human oncogene locations and chromosome aberrations. *Nature* 301:290.
- Salmon E. D. (1989) Cytokinesis in animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:43.
- Sherline P. and Schiavone K. (1978) High molecular weight MAPs are part of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 77:R9.
- Sherr C. J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73:1059.
- Sunkel C. E. and Coelho P. (1995) The elusive centromere: sequence divergence and functional conservation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:756.
- Vallee R. (1990) Dynein and the kinetochore. *Nature* 345:206.
- Weinberg R. A. (1982) Fewer and fewer oncogenes. *Cell* 30:3.
- Weinberg R. A. (1990) The retinoblastoma gene and cell growth control. *Trends Biochem. Sci.* 15:199.
- Weinberg R. A. (1991) Tumor suppressor genes. *Science* 254:1138.
- Zimmerman A. and Forer A. (1981) *Mitosis Cytokinesis*. Academic Press, New York.

16 / Meiosis. Fecundación

José Hib

MEIOSIS

16-1. La meiosis y la reproducción sexual

La meiosis es un tipo especial de división celular, exclusiva de los organismos que se reproducen sexualmente. En muchos protozoos, algas y hongos, la reproducción es asexual, es decir, por mitosis o división celular simple. En este caso todos los descendientes tienen una herencia que proviene de un solo antecesor. En cambio, en la mayoría de los organismos multicelulares —animales y vegetales— la reproducción se concreta por medio de *gametos* o células sexuales —ovocitos y espermatozoides—, los cuales se fusionan por un proceso denominado *fecundación*. Ello origina el *cigoto*, célula huevo que porta material hereditario de los dos progenitores y que se reproduce por mitosis hasta formar un nuevo individuo multicelular.

Los fenómenos básicos de la meiosis se exponen en la figura 16-1. El genoma humano tiene 46 cromosomas (44 + XY en el hombre; 44 + XX en la mujer). Si la reproducción fuese por mitosis, cada gameto tendría 46 cromosomas y el cigoto 92. Esto se repetiría en las próximas generaciones, y se produciría un aumento exponencial de acuerdo con el número de generaciones.

La *meiosis* (del griego *meioun*, disminuir) es el mecanismo usado por los organismos para evitar que ello suceda; así, mediante dos divisiones celulares consecutivas, las células sexuales reducen a la mitad el número de sus cromosomas, con generación de cuatro gametos *haploides* —cuatro *espermatozoides* en el hombre o un *ovocito* y tres *corpos polares* en la mujer—. Los procesos que llevan a la producción de gametos —llamados *espermatogénesis* y *ovogénesis*— tienen lugar en las gónadas, es decir, en los testículos y los ovarios.

Debe advertirse que para entender los aspectos más importantes de la citogenética (cap. 18) el lector debe tener una clara comprensión de la meiosis,

tanto desde el punto de vista de su estructura como de su bioquímica.

En este capítulo describiremos la meiosis como un tipo especial de división celular, en la que los procesos esenciales consisten en: 1) *reducción* del número de cromosomas a la mitad; 2) *segregación* al azar de los cromosomas homólogos paternos y maternos, y 3) *recombinación genética*, es decir, intercambio de segmentos cromosómicos;

Se define como *cromosomas homólogos* a las dos versiones de cromosomas idénticos —una aportada por el padre y la otra por la madre— que conviven en las células diploides. Dado que en las células somáticas humanas existen dos juegos haploides de 23 pares de cromosomas cada uno —un juego haploide aportado por el espermatozoide y otro por el ovocito—, se dice que poseen 23 pares de homólogos (fig. 10-14).

16-2. Diferencias entre la mitosis y la meiosis

Muchos de los fenómenos que hemos estudiado en la mitosis suceden también en la meiosis. Por ejemplo, la secuencia de cambios en el núcleo y en el citoplasma, los períodos de profase, prometáfase, metafase, anafase y telofase, la formación del huso mitótico, el ciclo de condensación de los cromosomas, la estructura y función de los centrómeros, etc. Existen, sin embargo, diferencias esenciales:

1. La mitosis tiene lugar en las células somáticas y la meiosis en las células sexuales.

2. En la mitosis cada replicación del ADN es seguida por una división celular; en consecuencia, las células hijas presentan la misma cantidad de ADN que la célula madre y un número diploide de cromosomas. En cambio, en la meiosis cada replicación del ADN es seguida por *dos divisiones* (I y II) y de ello resultan cuatro células haploides que contienen la mitad del ADN (fig. 16-2).

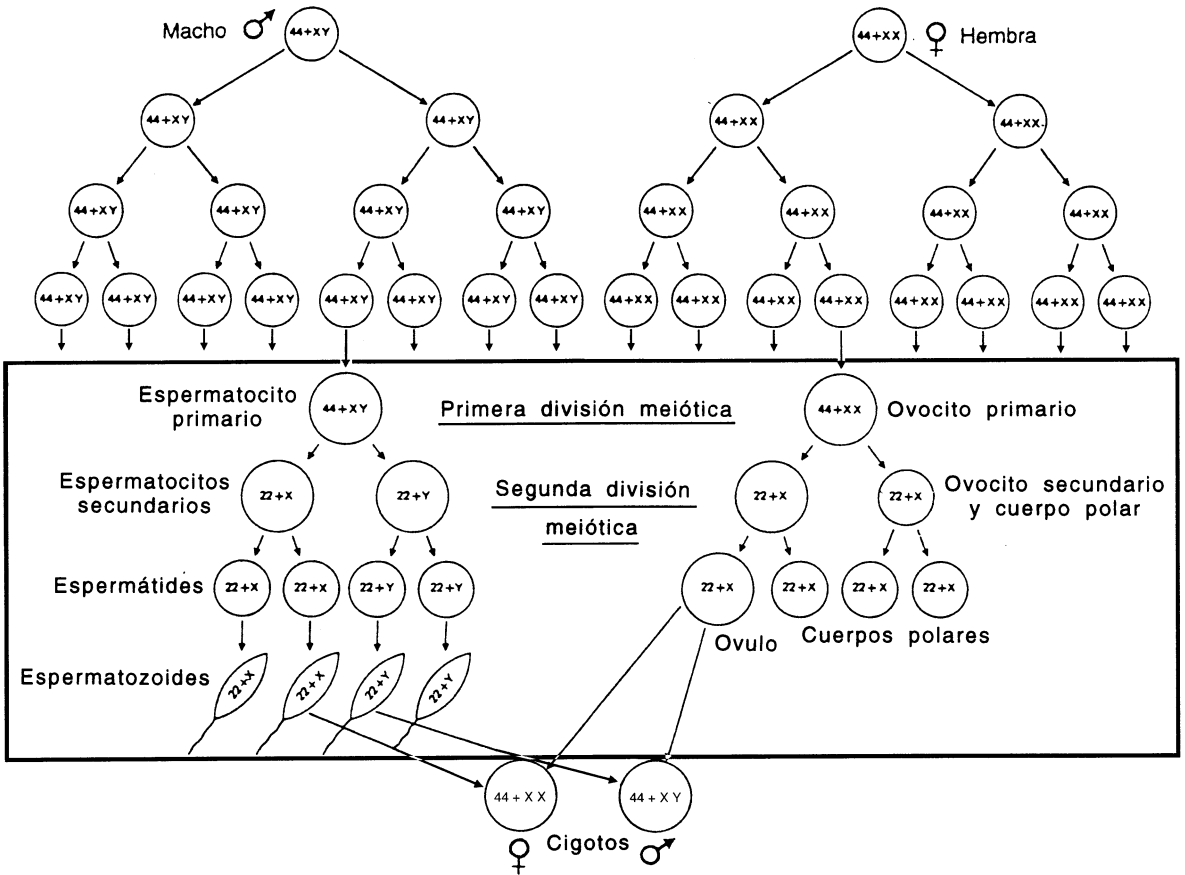


FIG. 16-1. Esquema de la espermatogénesis y la ovogénesis en el ser humano. Se observan tres divisiones mitóticas sucesivas por parte de las espermatogonias y las ovogonias, las respectivas divisiones meióticas y la fecundación del óvulo ($22 + X$) por el espermatozoide ($22 + X$ o $22 + Y$).

3. En la mitosis la síntesis del ADN se produce durante la fase S, que es seguida por la fase G2. En la meiosis, la fase S es más larga y la G2 es corta o falta.

4. En la mitosis cada cromosoma evoluciona en forma independiente. En la meiosis —durante la primera de sus divisiones— los cromosomas homólogos se relacionan entre sí (se *aparean*) e intercambian partes de sus moléculas (se *recombinan*) (fig. 16-2).

5. La duración de la mitosis es corta (1 hora aproximadamente), mientras que la de la meiosis es *bastante larga* (en el hombre tarda 24 días y en la mujer varios años).

6. Otra diferencia fundamental es que en la mitosis el material genético permanece constante en las sucesivas generaciones de células hijas (a menos que ocurran mutaciones o aberraciones cromosómicas), mientras que la meiosis da lugar a una gran *variabilidad genética*.

16-3. Descripción general de la meiosis

Como se observa en la figura 16-1, la división meiótica comienza después de varias divisiones mitóticas de las células sexuales precursoras —*espermatoгонias* y *ovogonias*—. En un momento dado, en la fase G1 de la interfase previa, se produce en esas células un cambio decisivo —cuya naturaleza precisa se desconoce— que las obliga a entrar en meiosis.

Desde el punto de vista del contenido de ADN, existen dos clases de células premeióticas, unas con $2n$ (diploides) y otras con $4n$ (tetraploides) (n es la cantidad haploide de ADN). En los *espermatoцитos I* y en los *ovocitos I* el ADN es siempre tetraploide ($4n$). Al cabo de la primera división meiótica, el contenido de ADN en los *espermatoцитos II* y en los *ovocitos II* es diploide ($2n$), y se convierte en haploide ($1n$) después de la segunda división meiótica, al formarse los *espermatozoides* y el *ovocito* (y los *cuerpos polares*) (fig. 16-3).

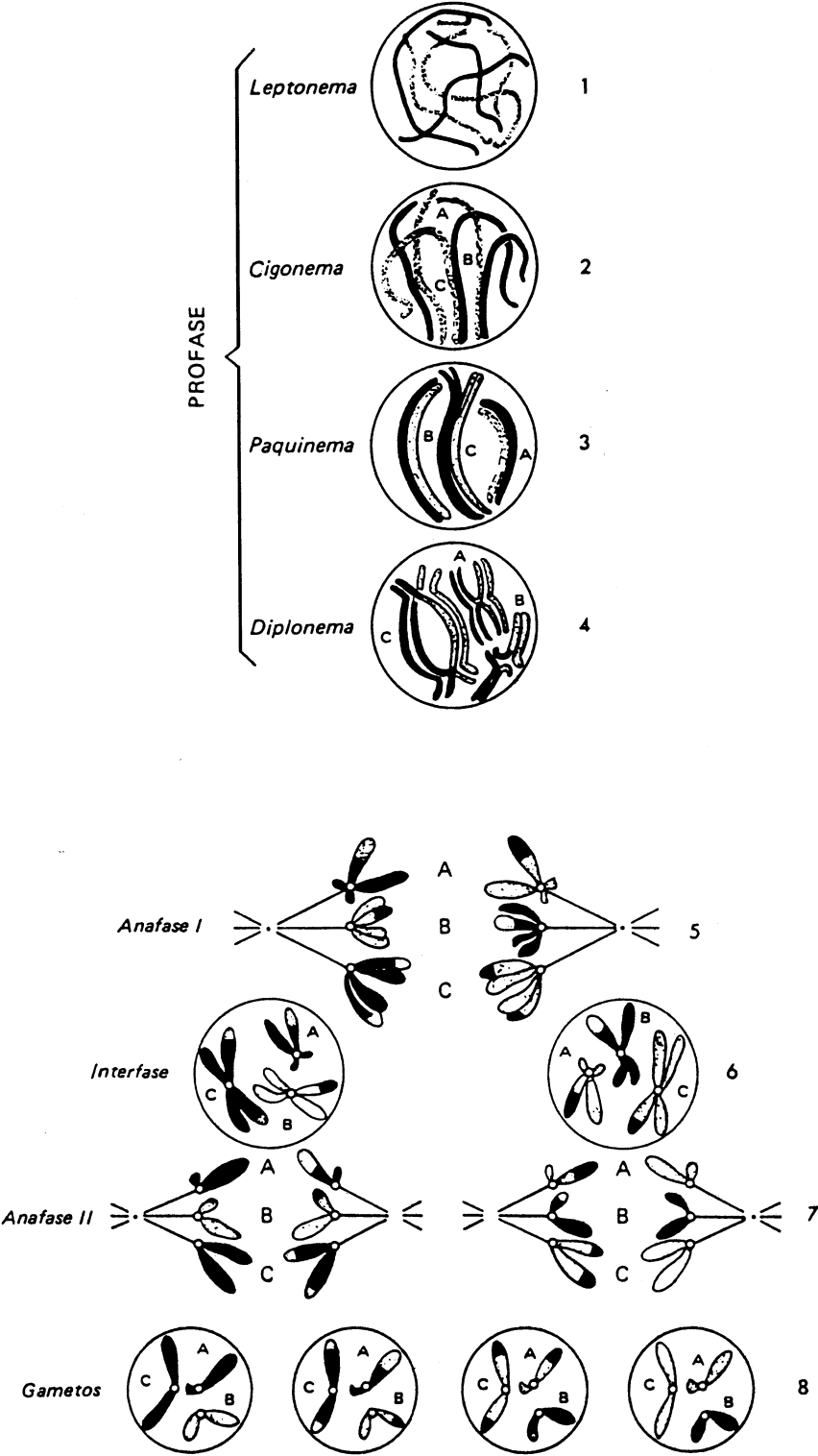
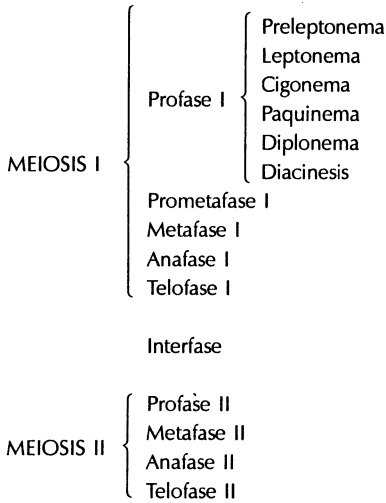


FIG. 16-2. Esquema general de la meiosis que ilustra el apareamiento de los cromosomas homólogos, el intercambio de algunos de sus segmentos y la segregación de esos cromosomas.

16-4. La meiosis comprende dos divisiones celulares

Ya dijimos que la meiosis comprende dos divisiones celulares: I y II. La primera división meiótica se distingue por su larga profase, durante la cual los cromosomas homólogos se aparean y recombinan para intercambiar material genético. Los períodos de la mitosis son insuficientes para describir los fenómenos que se producen en la meiosis, cuyos estadios progresan en el siguiente orden:



16-5. Durante el preleptonema los cromosomas son difíciles de observar

El *preleptonema* corresponde a la profase temprana de la mitosis. Los cromosomas son muy delgados y difíciles de observar.

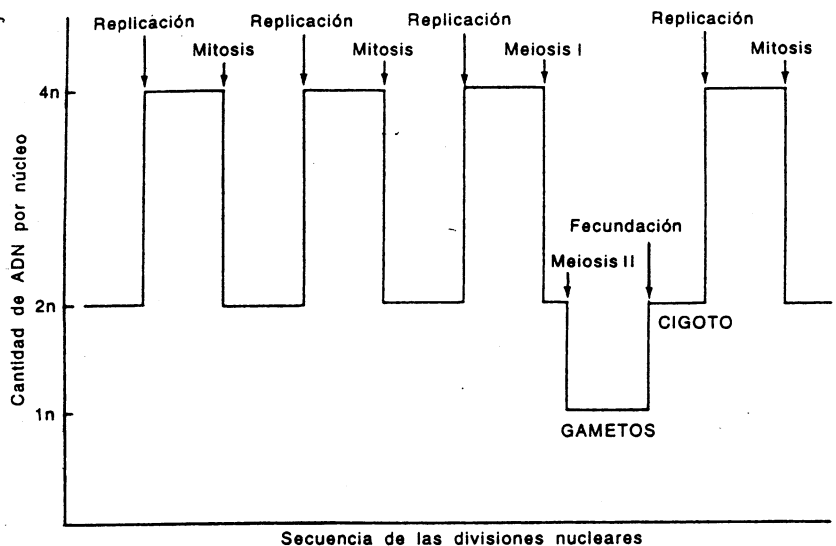
16-6. Durante el leptonema los cromosomas aparentan ser simples

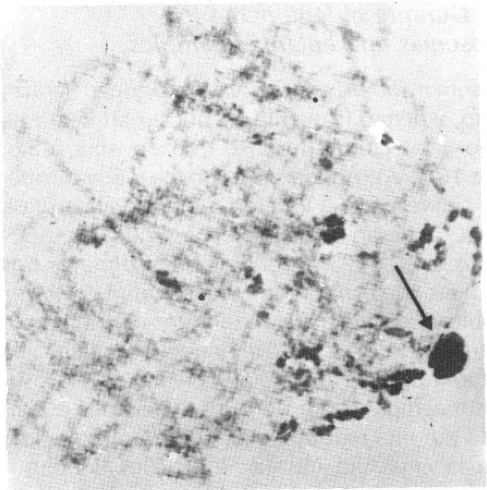
Al comenzar el *leptonema* (del griego *leptos*, delgado, y *nema*, filamento) el núcleo aumenta de tamaño y los cromosomas se tornan visibles (figs. 16-2 y 16-4, A). Además presentan una gran diferencia con respecto a los cromosomas de la profase mitótica: a pesar de haberse duplicado su ADN (durante la fase S), y por lo tanto contener *dos cromátidas cada uno*, parecen ser simples en vez de dobles. Con frecuencia los cromosomas forman asas cuyos extremos (los telómeros) se fijan a la envoltura nuclear en la región cercana al centrosoma. Este agrupamiento de los telómeros es acompañado por una redistribución de los poros nucleares en la envoltura nuclear, los cuales tienden a acumularse entre los sitios de fijación de los cromosomas (fig. 16-5).

16-7. Durante el cigonema se produce el apareamiento de los cromosomas homólogos, entre los cuales se forma el complejo sinaptonémico

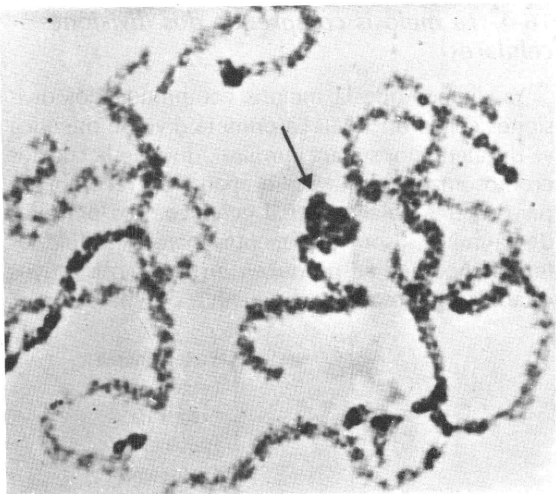
Durante el *cigonema* (del griego *zygón*, pareja) tiene lugar el primer fenómeno esencial de la meiosis. Los cromosomas homólogos se alinean entre sí mediante un proceso denominado *apareamiento* (o *sinapsis*) (fig. 16-2). El apareamiento comprende la formación de una estructura compleja —observable con la ayuda del microscopio electrónico—, conocida con el nombre de *complejo sinaptonémico* (CS) (figs. 16-6 y 16-7). El proceso puede comenzar en cualquier punto de los cromosomas. Así, en algunos casos los homólogos se unen pri-

FIG. 16-3. Cambios en el contenido del ADN nuclear durante las mitosis previas a las divisiones meióticas y durante el transcurso de estas últimas, en los gametos y en el cigoto (éste se vuelve a dividir por mitosis). 1n, contenido haploide de ADN. 2n, contenido diploide de ADN. 4n, contenido tetraploide de ADN.

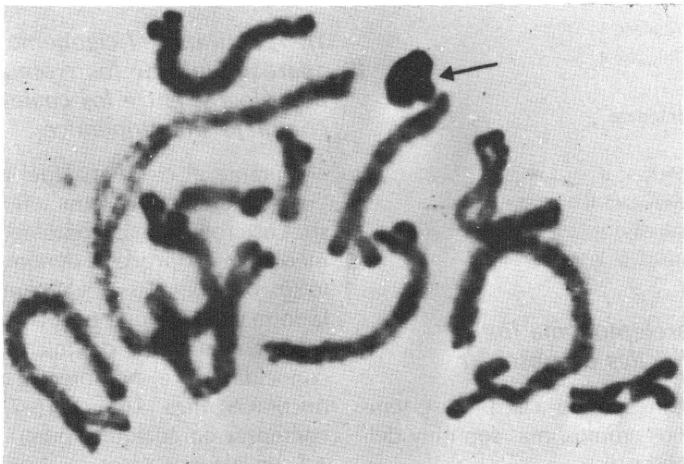




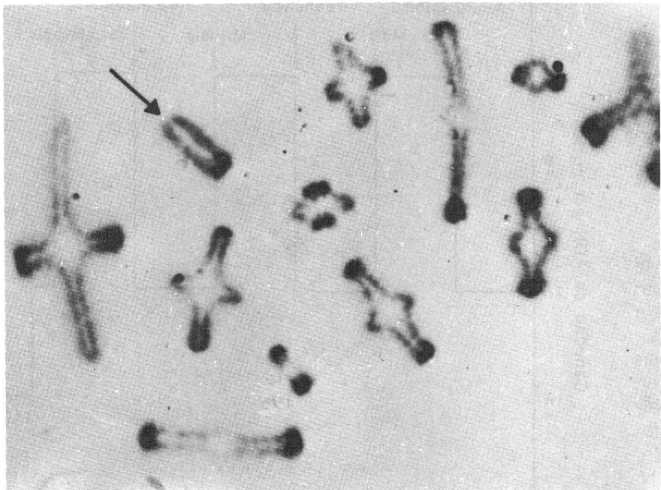
A. LEPTONEMA



B. PAQUINEMA



C. DIPLONEMA



D. DIPLONEMA

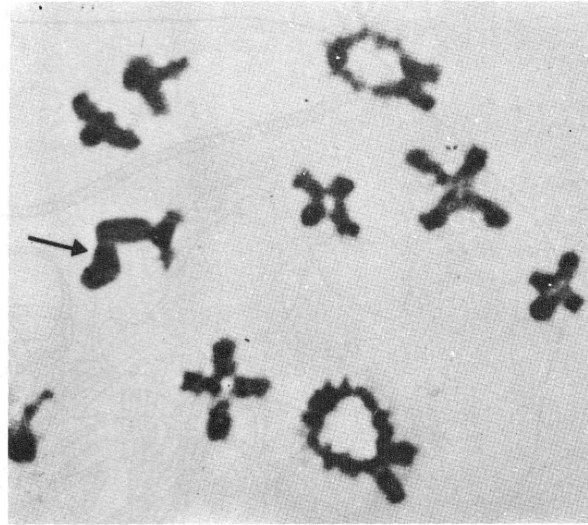
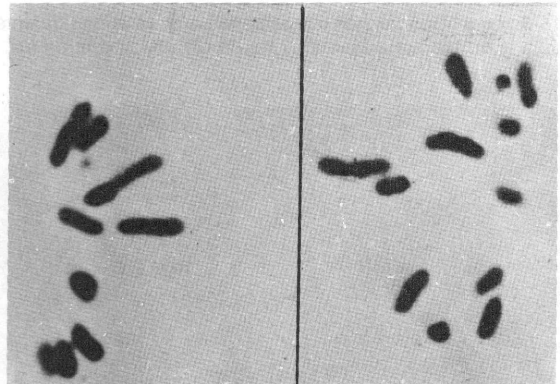


FIG. 16-4. Etapas de la meiosis de la langosta *Laplatacris dispar* ($2n = 22 + X$). El cromosoma X aparece señalado por una flecha. (De F. A. Sáez.)

E. DIACINESIS



F. METAFASE I



G. ANAFASE II

mero a nivel de uno de sus extremos y la unión progresa hacia el otro extremo como un cierre relámpago. En otros, en cambio, la asociación se produce simultáneamente en varios puntos a lo largo de los homólogos. El apareamiento es muy exacto y específico, pues se produce punto por punto en cada par de homólogos. Ambos cromosomas quedan separados por un espacio de unos 200 nm, que es ocupado por el complejo sinaptonémico.

El CS se halla integrado por dos componentes laterales y uno central (figs. 16-6 y 16-7). Los *componentes laterales* se desarrollan al final del leptonema y el *central* lo hace en el curso del cigonema. Como es de esperar, sobre cada componente lateral se aplican las dos cromátidas hermanas de uno de los cromosomas homólogos.

En un corte transversal, los componentes laterales se hallan separados del componente central por

espacios regulares de idéntico ancho. En conjunto, el CS tiene el aspecto de una escalera, con *puentes* que la cruzan a intervalos de 20 a 30 nm. Tales puentes, formados por delgados filamentos, cruzan perpendicularmente todo el ancho del CS, desde un componente lateral al otro, y sus extremos —saliendo del complejo— se ligan a la cromatina perteneciente a ambas cromátidas hermanas de los correspondientes cromosomas homólogos. Los componentes laterales están constituidos por proteínas básicas, mientras que el componente central y los filamentos perpendiculares contienen ADN.

En ambas cromátidas hermanas las fibras de cromatina de 30 nm forman asas, cada una de las cuales contiene entre 5 y 25 μm de ADN. Como se ilustra en la figura 16-8, durante el leptonema las asas de cromatina adoptan una disposición laxa en el eje del cromosoma. Después, a medida que

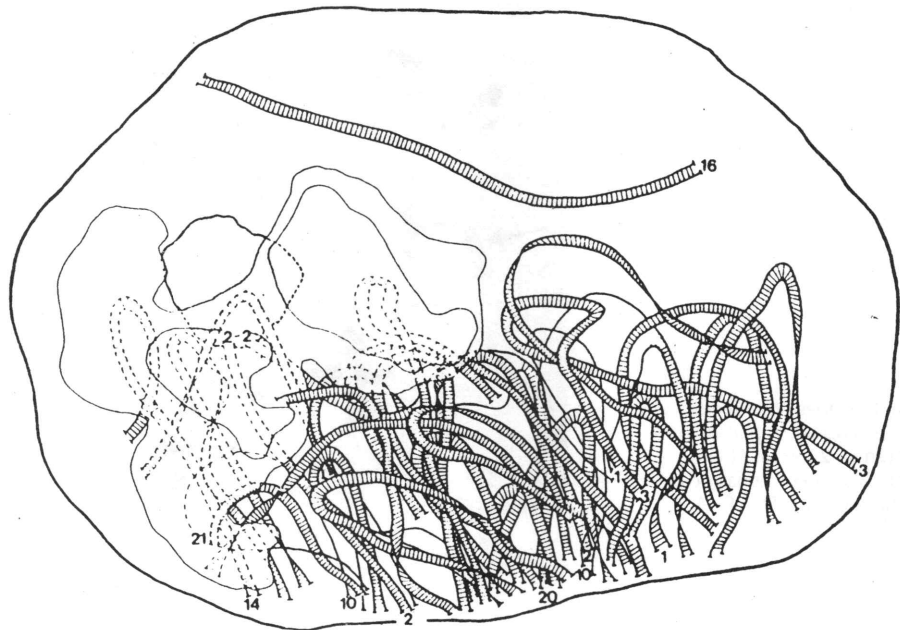


FIG. 16-5. Formación de asas por parte de los cromosomas durante la profase de la primera división meiótica. Los telómeros se fijan a la envoltura nuclear en la región cercana al centrosoma. (Cortesía de S. W. Rasmussen.)

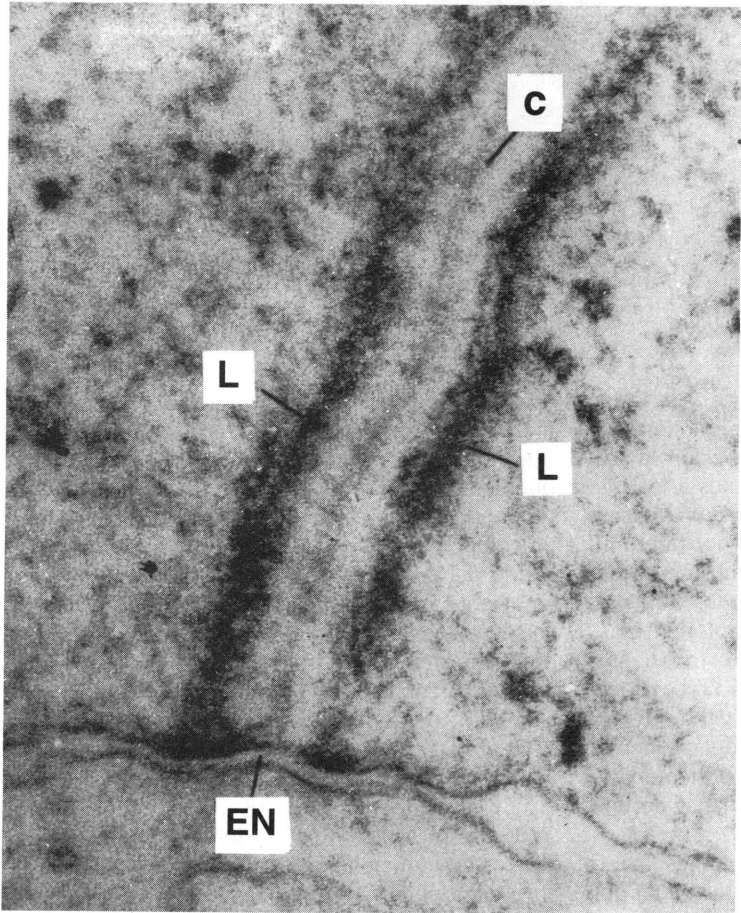


FIG. 16-6. Micrografía electrónica de un complejo sinaptonémico que muestra los componentes laterales (L) de los cromosomas homólogos y el componente central (C). Obsérvese cómo los telómeros se fijan a la envoltura nuclear.

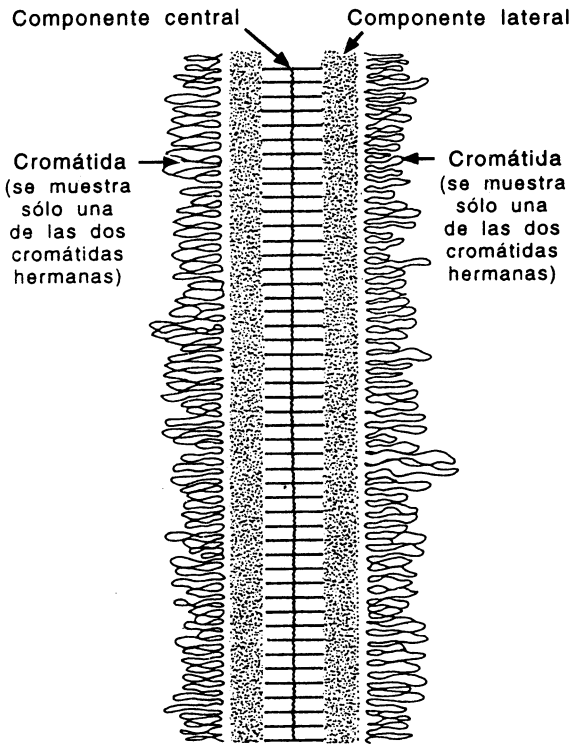


FIG. 16-7. Esquema del complejo sinaptonémico, con los componentes laterales, el componente central y los puentes entre las cromátidas homólogas.

la cromatina se condensa, las asas se colocan cada vez más juntas y aparecen en el lado en que nacen las proteínas con que se construyen los componentes laterales del CS. Más aún, igual que en los cromosomas mitóticos, en los meióticos existe un armazón de proteínas no histónicas para sostener a las asas de cromatina (fig. 16-8); la diferencia con los meióticos es que a éstos se les agregan los componentes del CS.

La fijación de los telómeros a la envoltura nuclear ordena espacialmente a los cromosomas, lo que favorece el alineamiento de los homólogos. Una vez formados los CS, sus extremos también se insertan en la envoltura nuclear (fig. 16-6). En los puntos en que lo hacen aparecen engrosamientos llamados *placas de fijación*.

Una de las funciones del CS es la de estabilizar el apareamiento de los homólogos y con ello facilitar su ulterior *recombinación*. Así, las moléculas proteicas de sus componentes laterales hacen que los ADN de los cromosomas homólogos se dispongan de manera tal que el intercambio entre ellos resulte favorecido. En consecuencia, el CS debe ser considerado como un armazón proteico que se construye para que tenga lugar el alineamiento y la recombinación de los homólogos.

Cuando comienza el apareamiento, el acortamiento de los cromosomas ya es muy pronunciado y existe por lo menos una relación 300:1 entre el largo del ADN y la longitud cromosómica. Esto significa que sólo el 0,3% del ADN de los cromosomas homólogos se halla en contacto directo con los componentes laterales del CS.

En la figura 16-9 se observan todos los CS de un cariotipo humano (cap. 10-12) construido a partir de un espermatocito I en período paquiténico. Muestra los 22 pares de homólogos y el par XY. Las características especiales que deberá reconocer el estudiante en este preparado son: 1) los cinetocoros, que aparecen como prominencias en los componentes laterales de los CS (serán analizados más adelante); 2) los organizadores nucleolares en los pares 13, 14, 15, 21 y 22, y 3) el par XY, con una corta región apareada y una porción larga del cromosoma X que permanece sin aparear.

16-8. Durante el *paquinema* se produce la *recombinación entre las cromátidas hermanas*

Durante el *paquinema* (del griego *pachys*, grueso) los cromosomas se acortan y se completa el apareamiento de los cromosomas homólogos (figs. 16-2 y 16-4, B). Pero lo más importante es que se produce el intercambio de segmentos entre las cromátidas homólogas, fenómeno que lleva el nombre de *recombinación genética* (o *crossing-over*). Así, se producen rupturas transversales en las dos cromátidas —en ambas al mismo nivel—, seguidas por el intercambio y la fusión de los segmentos intercambiados (fig. 16-10). La secuencia de sucesos que conduce a la recombinación de dos cromátidas homólogas puede ser observada en las figuras 16-11 (*modelo de Holliday*) y 16-12.

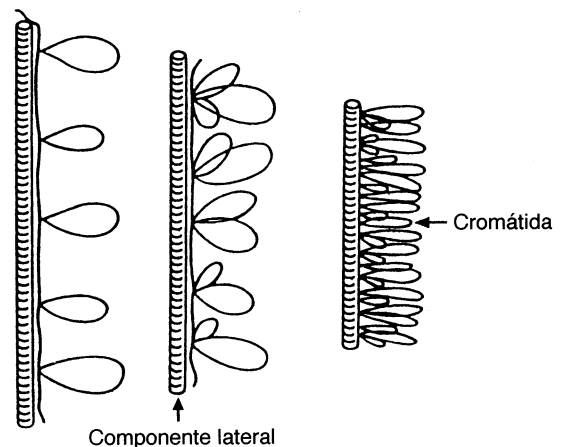


FIG. 16-8. Formación de asas de cromatina cada vez más compactas a medida que avanza la profase de la primera división meiótica.

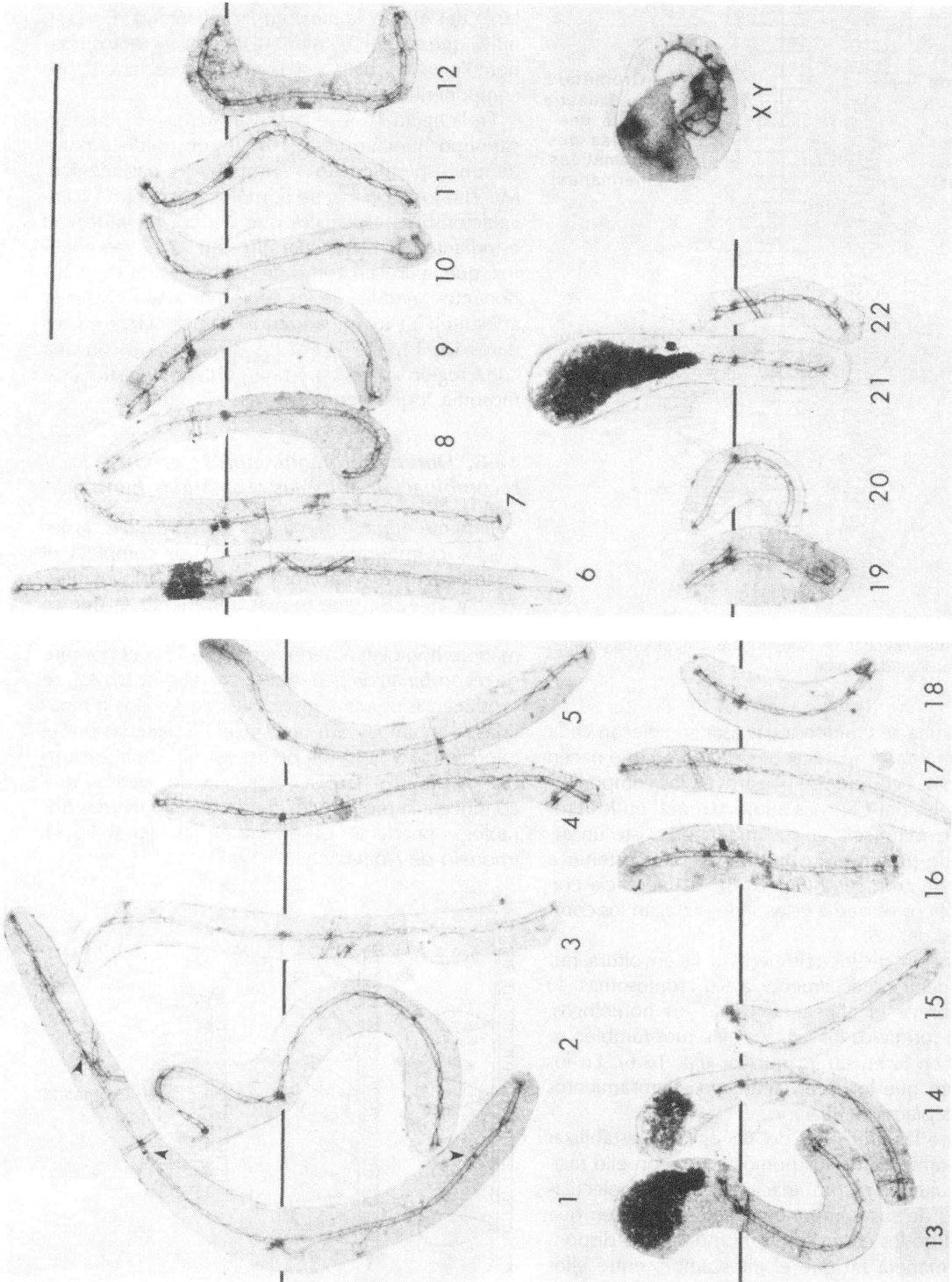


Fig. 16-9. Micrografía electrónica de un cariotipo humano completo en el que se observan todos los complejos sinaptonémicos. Se ven los 22 pares de autosomas y el par XY ordenados por tamaño. La línea pasa por los centrómeros. El preparado fue realizado con la técnica de microextendido seguido de coloración con ácido fosfotúngstico. (Cortesía de A. J. Solari.)

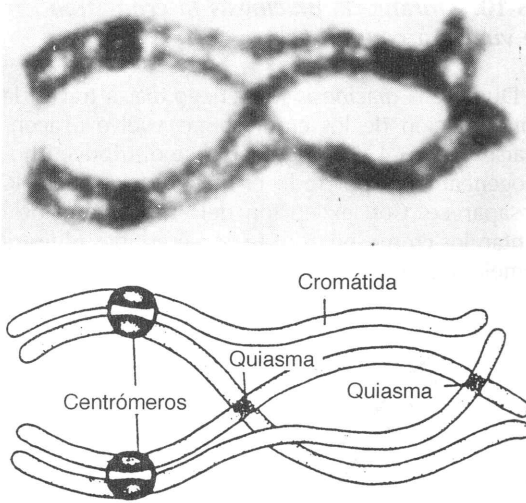


FIG. 16-10. Micrografía electrónica de un bivalente y su interpretación. Se observan dos quiasmas y la posición de los centrómeros. Los centrómeros hermanos se hallan unidos.

El paquinema es un proceso relativamente largo; así, mientras el leptonema y el cigonema duran horas, la duración del paquinema se mide en días.

En el paquinema el núcleo parece contener un número haploide de cromosomas, pero no es así, ya que cada una de las unidades visibles está compuesta por dos cromosomas independientes, aunque íntimamente apareados. Por tal motivo, cada par de cromosomas apareados recibe el nombre de *bivalente*. Como posee cuatro cromátidas, también se llama *tétrada* (figs. 16-10 y 16-13).

En cada cromosoma homólogo las dos cromátidas hermanas se hallan conectadas por un centrómero, de modo que en una tétrada existen dos centrómeros, uno por cromosoma. Como en la mitosis, cada centrómero está asociado a dos *cinetocoros*, uno para cada cromátida hermana. Sin embargo, hasta la finalización de la primera división meiótica los cinetocoros hermanos se solidarizan entre sí y se comportan como si fueran una sola unidad (fig. 16-14).

Por otra parte, a lo largo de los bivalentes aparece sobre cada CS una sucesión de nódulos densos de unos 100 nm de diámetro, llamados *nódulos de recombinación* (fig. 16-15). Su número y su localización son equivalentes a los de los sitios de recombinación genética, lo cual sugiere que es a nivel de estos nódulos que se produce el intercambio de los segmentos de las cromátidas homólogas.

Para que se produzca la recombinación, las moléculas de ADN de las cromátidas homólogas deben situarse, en el componente central del CS, a una distancia de 1 nm aproximadamente. Se cree que el contacto se podría lograr mediante los puentes transversales que conectan a las cromátidas ho-

mólogas. Por ellos se buscarían las secuencias de nucleótidos homólogas, paso imprescindible para que tenga lugar el intercambio de los segmentos del ADN. El nódulo de recombinación podría considerarse como la expresión morfológica de ese intercambio. Más aún, el nódulo constituiría un gran complejo multienzimático, encargado de reunir a las cromátidas paternas y maternas y producir en ellas los cortes y empalmes necesarios para su recombinación.

Tales cortes y empalmes son complejos y se producen en la forma ilustrada y explicada en la figura 16-16. Como se observa, el proceso necesita de una limitada *síntesis de ADN*, semejante a la que tiene lugar durante la reparación del ADN (cap. 14-20).

16-9. Durante el diplonema los cromosomas apareados se separan, aunque en algunos puntos permanecen unidos

Durante el *diplonema* (del griego *diplóos*, doble) los cromosomas homólogos comienzan a separarse, por lo que las cromátidas de la tétrada se vuelven visibles y el complejo sinaptonémico se desintegra (figs. 16-2 y 16-4, C y D). Sin embargo, la separación no es completa, ya que las cromátidas homólogas permanecen conectadas a la altura de los puntos donde ha tenido lugar el intercambio (figs. 16-4, D y 16-10). Tales conexiones, llamadas *quiasmas* (del griego *khíasma*, cruz), expresan la etapa final de la recombinación, pues muestran a los cromosomas homólogos en vías de separarse todavía ligados a nivel de esos puntos. El número de quiasmas es variable, ya que pueden aparecer pares de cromosomas homólogos con un solo quiasma (es el número mínimo) y otros con varios.

El diplonema en la mujer es un período extraordinariamente largo. Así, todos los ovocitos I arriban a esta fase del ciclo celular antes del séptimo mes de la vida intrauterina y permanecen en tal fase como mínimo hasta la pubertad (sección 16-15).

En el diplonema, diversos sectores de la cromatina experimentan un fuerte desenrollamiento. Situaciones extremas de este fenómeno se observan en los peces, los anfibios, los reptiles y las aves, en los que el desenrollamiento es tan acentuado que los bivalentes suelen asumir una configuración especial —emiten finas proyecciones laterales—, motivo por el cual se los llama *cromosomas plumulados* o *en cepillo* (fig. 16-17). Esas proyecciones son asas de cromatina muy desenrolladas, con su ADN transcribiéndose a gran velocidad. Así, tal configuración cromosómica expresa una intensa síntesis de ARN por parte de la célula, que es la causa esencial del enorme crecimiento que experimenta el ovocito antes de ser expulsado del ovario. En algunas

de las clases zoológicas nombradas, a lo largo de los cromosomas pueden detectarse engrosamientos de cromatina dispuestos entre las asas —llamados cromómeros—, con un aspecto de collar de cuentas (fig. 16-17). Los cromómeros corresponden a sectores de cromatina altamente condensada, al contrario de la cromatina de las asas, que como acabamos de ver se encuentra bastante desenrollada. Los cromómeros comienzan a verse en los bivalentes a partir del leptonema.

16-10. Durante la diacinesis la cromatina se vuelve a condensar

Durante la *diacinesis* (del griego *día*, a través) la condensación de los cromosomas vuelve a acentuarse (fig. 16-4, E). Las tétradas se distribuyen homogéneamente por todo el núcleo, y el nucléolo desaparece. Con excepción del aspecto que presentan los cromosomas, este breve estadio muestra semejanzas con la profase tardía de la mitosis.

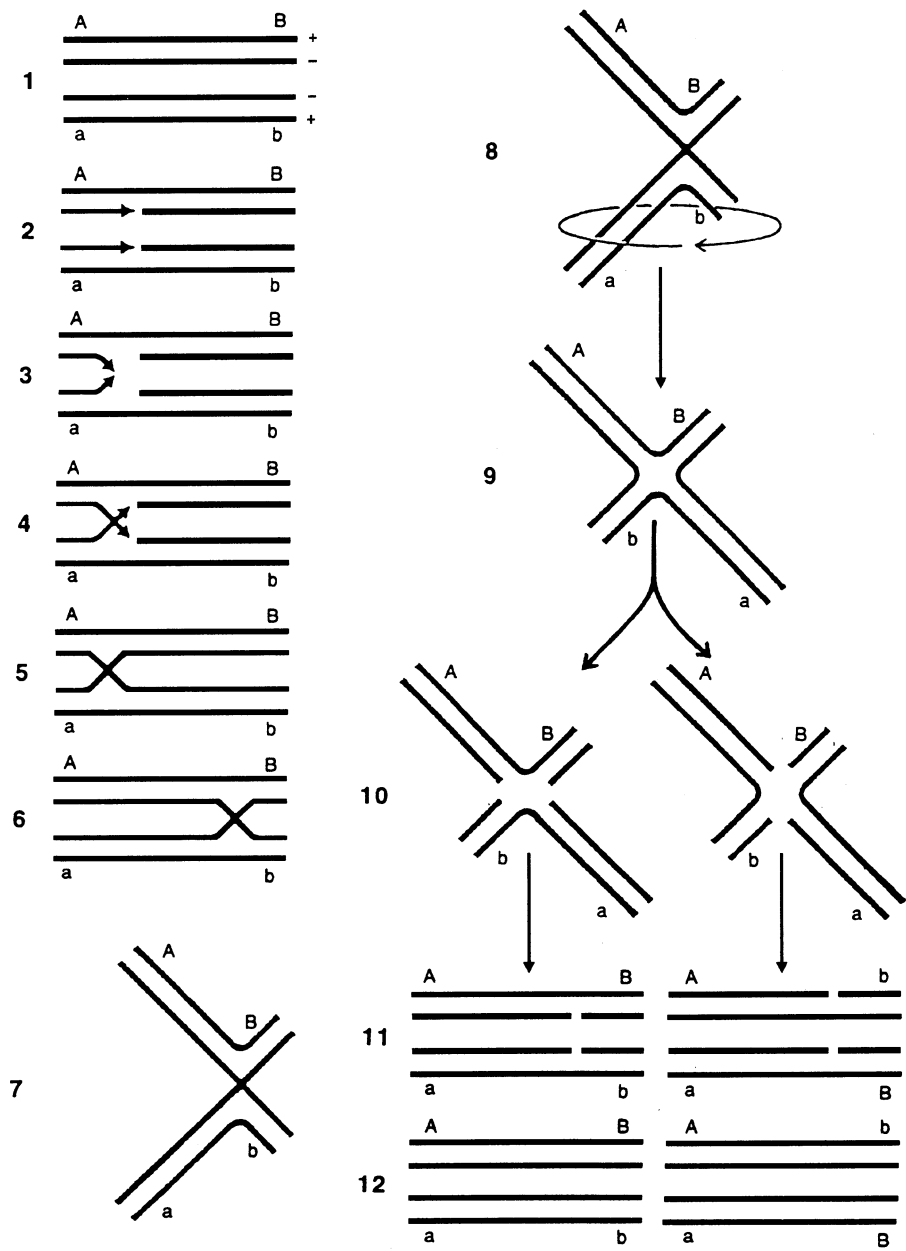


FIG. 16-11. Proceso que lleva a la recombinación génica entre cromátidas homólogas, según el modelo de Holliday.

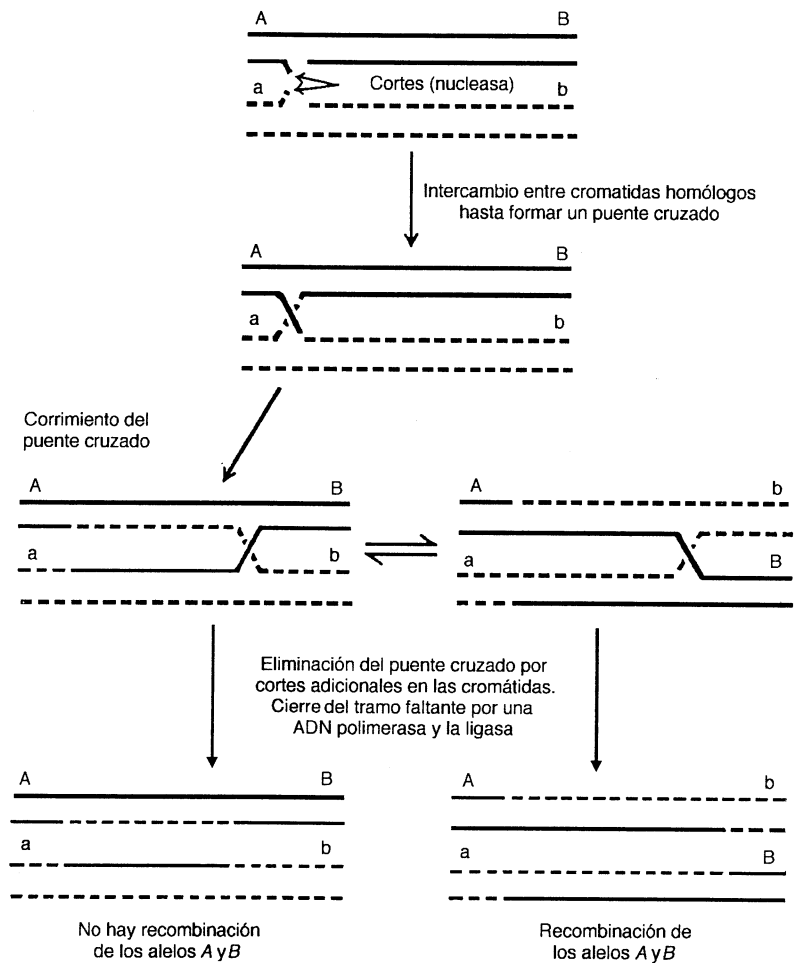


FIG. 16-12. Modelo que explica el proceso de recombinación genética entre ambos pares de cromátidas homólogas.

16-11. En las restantes etapas de la división meiótica I los cromosomas homólogos se separan y son conducidos hacia los polos opuestos de la célula

Durante la *prometáfase I* la condensación de los cromosomas alcanza su grado máximo. La envoltura nuclear desaparece y los microtúbulos del huso se conectan con los cinetocoros. Esta conexión es distinta de la de la mitosis porque las fibras del huso provenientes de cada polo celular se asocian con los dos cinetocoros hermanos y no con uno (en la sección 16-8 dijimos que en la meiosis I los cinetocoros hermanos se comportan como una unidad).

Durante la *metafase I* los bivalentes se disponen en el plano ecuatorial de la célula (fig. 16-4, F). Debido al modo como se conectan las fibras del huso, los cinetocoros de cada cromosoma homólogo se orientan de forma tal que quedan "mirando" hacia un mismo polo (fig. 16-14). Los bivalentes continúan exhibiendo sus quiasmas; cuando los cromosomas son cortos, los quiasmas se localizan en los extremos de los homólogos (quiasmas termi-

nales); cuando se trata de cromosomas largos, aparecen a distintas alturas a lo largo de sus ejes (quiasmas intersticiales).

Durante la *anafase I* los cinetocoros son traccionados hacia los polos opuestos, de modo que los homólogos de cada bivalente —cada uno integrado por dos cromátidas hermanas— se separan entre sí y se movilizan en direcciones contrapuestas (figs. 16-2 y 16-14). La observación de los bivalentes en esta fase permite comprobar que la recombinación genética se produjo en forma alternada. Así, en algunos tramos del cromosoma la recombinación tuvo lugar entre un par de cromátidas homólogas —no estamos diciendo "hermanas"— y en otros tramos ocurrió entre las cromátidas del otro par. En consecuencia, al separarse por completo los cromosomas homólogos, en las células hijas las dos cromátidas de cada cromosoma serán mixtas —tendrán segmentos cromosómicos paternos y maternos alternados— (fig. 16-18).

Durante la *telofase I* los grupos cromosómicos haploides llegan a sus respectivos polos y en torno de ellos se reconstruye la envoltura nuclear.

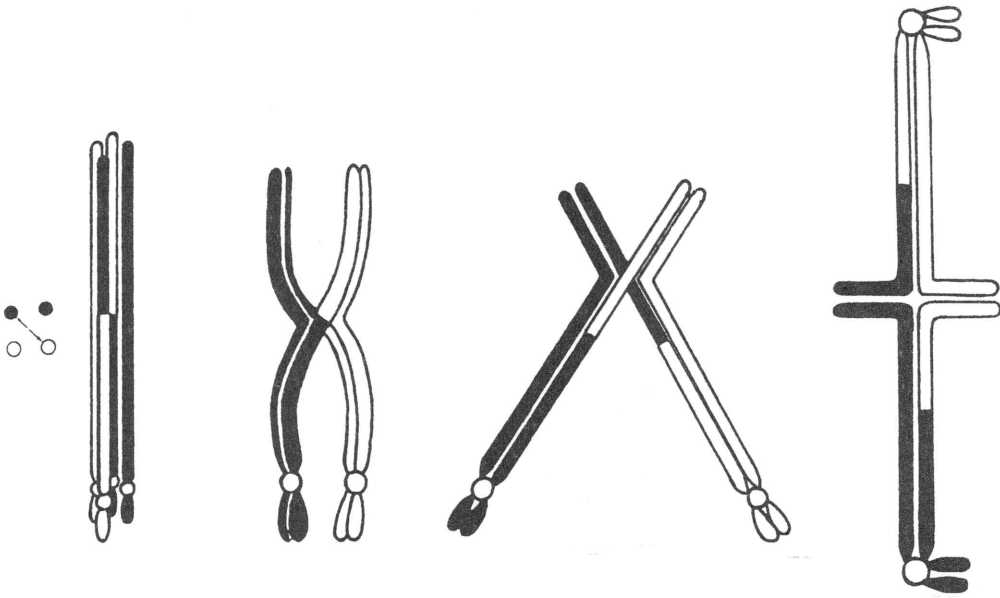


FIG. 16-13. Esquemas que muestran cómo se forma un bivalente (tétrada) y explican el desarrollo de un quiasma y la rotación de las cromátidas.

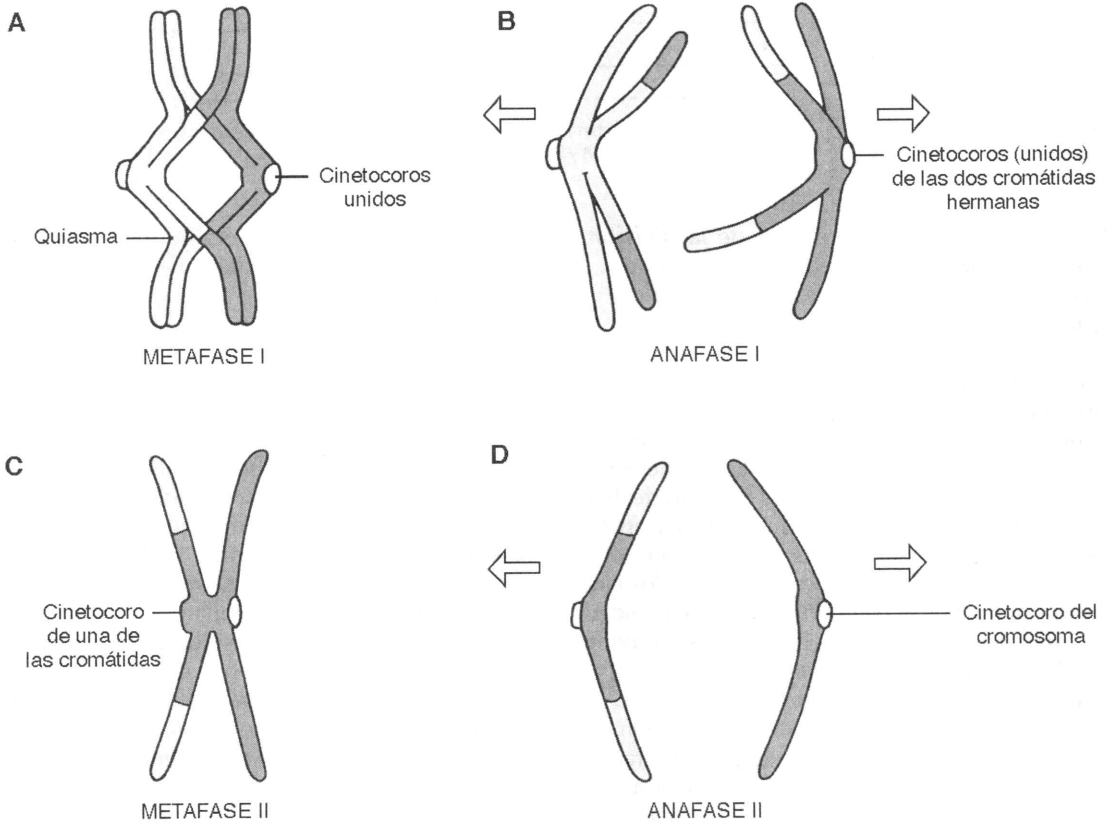


FIG. 16-14. Evolución seguida por las cromátidas hermanas y los cinetocoros durante la primera y la segunda división meiótica.

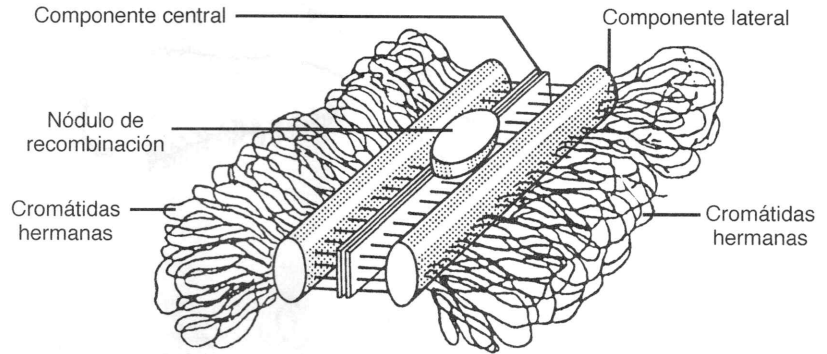


FIG. 16-15. Visión tridimensional del complejo sinaptonémico, con un nódulo de recombinación.

16-12. Entre las dos divisiones meióticas existe una interfase de corta duración

La telofase es seguida por la partición del citoplasma, y existe en las dos células hijas un corto período de *interfase* en el que no hay replicación del ADN (no hay fase S). Por consiguiente, las células hijas derivadas de la primera división meiótica poseen un número haploide de cromosomas, cada

uno compuesto por dos cromátidas hermanas (fig. 16-2).

En el hombre, el resultado de la primera división meiótica es la formación de dos células hijas iguales, denominadas *espermatoцитos II*. En la mujer, debido a que el reparto del citoplasma es sumamente desigual, el resultado es la formación de dos células de muy distinto tamaño: el *ovocito II* y un *cuerpo polar* (este último se pierde) (fig. 16-1).

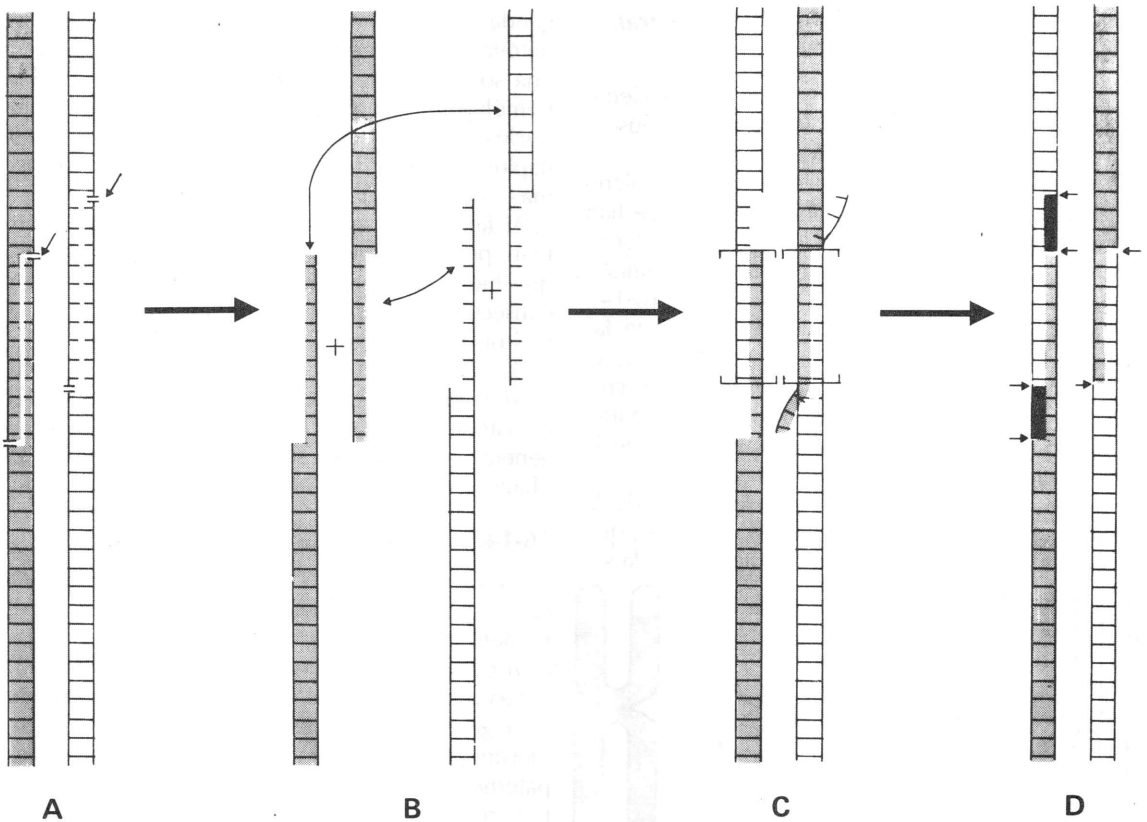


FIG. 16-16. Modelo molecular de recombinación génica. El ADN de las cromátidas apareadas es cortado por endonucleasas. Los segmentos opuestos de las cromátidas homólogas se unen entre sí. Los trozos de ADN sobrantes son eliminados, mientras que los tramos incompletos son cubiertos por un mecanismo semejante al de la reparación del ADN. (De C. A. Thomas Jr., modificado.)

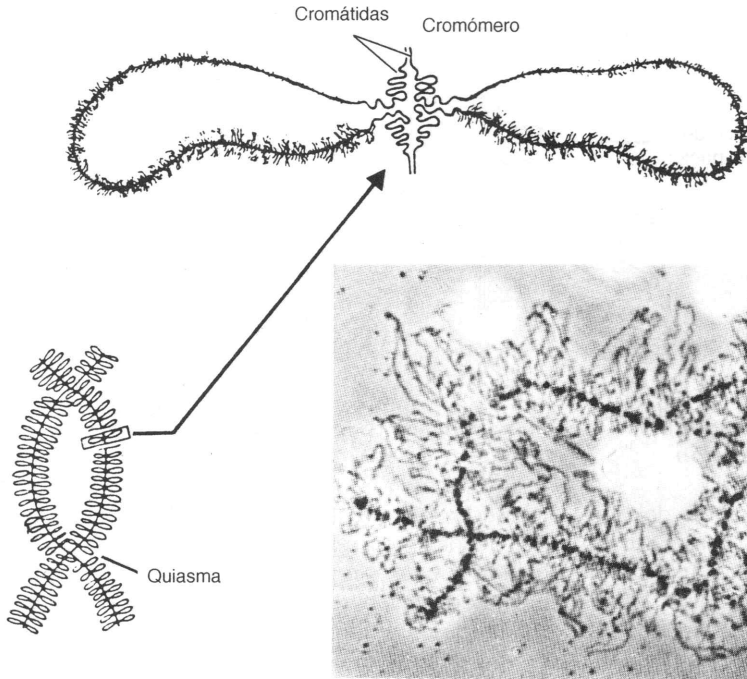


FIG. 16-17. Cromosomas plumulados o en cepillo. La figura de la izquierda representa un esquema con poco aumento, que muestra dos quiasmas y las asas laterales simétricas. La de arriba, a mayor aumento, exhibe dos asas laterales y la compactación de las cromátidas a nivel del cromómero. (Cortesía de O. L. Miller Jr.) La micrografía (contraste de fases) permite observar la sucesión de cromómeros, lo cual genera una imagen con aspecto de collar de cuentas. (Cortesía de U. Scheer.)

16-13. En la división meiótica II se separan las cromátidas hermanas

La *profase II* es muy corta, aunque suficiente para permitir la reaparición de las fibras del huso y la desaparición de la envoltura nuclear.

La *metafase II* lleva a los cromosomas al plano ecuatorial de la célula. Las fibras del huso se han conectado a los cinetocoros, los cuales se colocan como en los cromosomas mitóticos, uno apuntando a un polo y el otro al polo opuesto (fig. 16-14).

En la *anafase II*, debido a la tracción que las fibras del huso ejercen sobre los cinetocoros, el centrómero se divide. Como consecuencia, las cromátidas hermanas de cada cromosoma se separan y son traccionadas hacia los polos opuestos de la célula (figs. 16-2, 16-4, G y 16-14).

En la *telofase II* cada uno de los polos de la célula recibe un juego haploide de cromátidas, que pasan a llamarse cromosomas. Como vemos, la se-

gunda división meiótica se asemeja a la división mitótica, excepto en que los núcleos hijos reciben una sola copia de cada cromosoma y no los dos homólogos. La formación de una nueva envoltura nuclear en torno de cada conjunto cromosómico haploide —seguida por la partición del citoplasma— pone fin a la meiosis (fig. 16-2).

Al finalizar la segunda división meiótica se forman, por cada espermatocito II, dos *espermátides*, que luego se diferencian en *espermatozoides*. En consecuencia, a partir de un espermatocito I la meiosis genera cuatro espermatozoides (fig. 16-1). En la mujer, en cambio, cuando concluye la segunda división meiótica —al partirse el citoplasma del ovocito I, otra vez en forma desigual—, el ovocito II genera un *óvulo* y un segundo *cuerpo polar* (este último se pierde) (fig. 16-1).

16-14. Consecuencias genéticas de la meiosis

En la sección 16-1 dijimos que los procesos esenciales de la meiosis son: 1) la *reducción* del número de cromosomas a la mitad; 2) la *segregación* de los cromosomas paternos y maternos, y 3) la *recombinación genética*. Así, desde el punto de vista genético, la meiosis puede considerarse un mecanismo destinado a distribuir al azar los genes paternos y maternos en los gametos, tanto mediante la recombinación genética como por la segregación de los cromosomas homólogos.

En la figura 16-19 pueden observarse las consecuencias genéticas de la meiosis en una célula hipotética con tres pares de cromosomas homólogos,

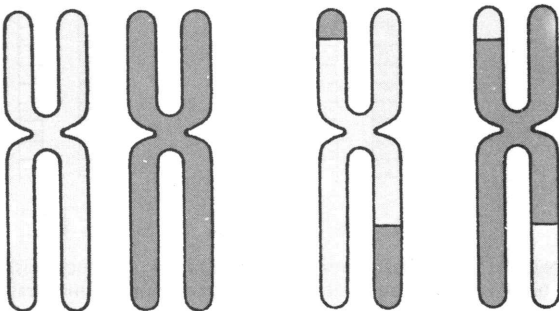


FIG. 16-18. Resultado de la recombinación génica al cabo de la anafase I.

en los cuales se produjeron uno, dos y tres segmentos de recombinación, respectivamente. Tales segmentos son señalados por los quiasmas, y se ve que la recombinación ha tenido lugar sólo en uno de

los dos pares de cromátidas homólogas. Al seguirse las consecuencias derivadas de la asociación de ambos procesos —la recombinación genética y la segregación de los homólogos—, se podrá observar

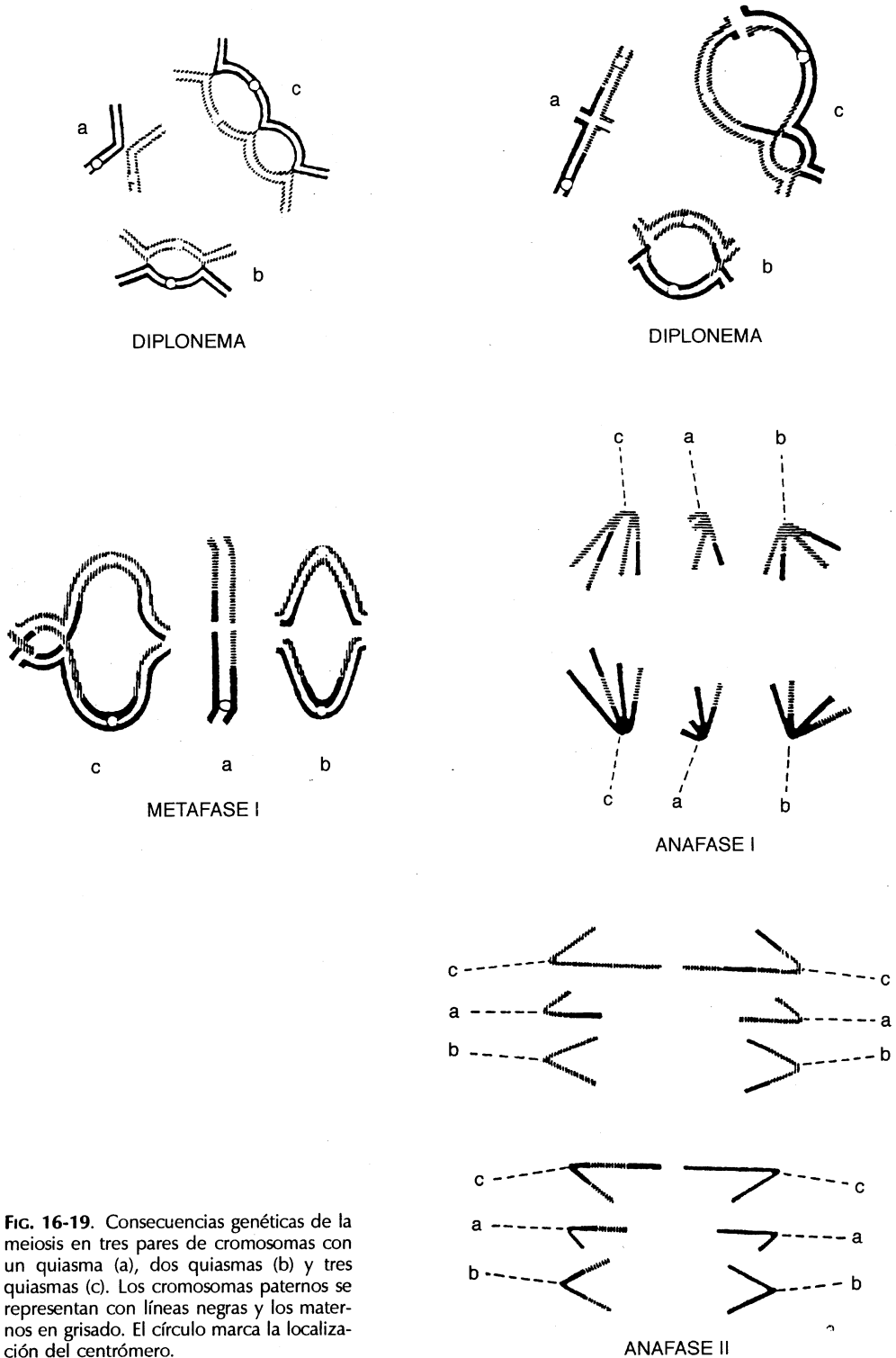


FIG. 16-19. Consecuencias genéticas de la meiosis en tres pares de cromosomas con un quiasma (a), dos quiasmas (b) y tres quiasmas (c). Los cromosomas paternos se representan con líneas negras y los maternos en grisado. El círculo marca la localización del centrómero.

que cada uno de los cuatro gametos a que da origen la meiosis hereda conjuntos de genes diferentes. En la sección 16-11 se expresó que, en segmentos alternados, la recombinación se produce en los dos pares de cromátidas homólogas, por lo cual en cada gameto todos los cromosomas exhiben segmentos maternos y paternos alternados.

Las segregaciones al azar de los cromosomas paternos y maternos durante las anafases I y II también contribuyen a la *diversidad genética* de los gametos, pero en distinto grado. Esto no se aprecia en la figura 16-19, ya que muestra el caso (teóricamente posible) en que los cromosomas maternos y paternos se segregan en bloque en ambas anafases. Dado que el hombre posee 23 pares de cromosomas homólogos (46 cromosomas) en las células predecesoras de los gametos, las combinaciones de segregación posibles alcanzan el número de 8.388.608 (2^{23}). A ellas deben sumarse las incontables posibilidades de segregación de los genes mediante la recombinación.

Accidentalmente, la segregación de los homólogos puede fallar, de manera que los dos homólogos de un par no se separan y pasan juntos a una de las células hijas. Este fenómeno —llamado *no disyunción*— puede ocurrir tanto en la primera como en la segunda anafase (cap. 17-9). Como consecuencia, unos gametos contendrán un cromosoma de más (24) y otros uno de menos (22). Si uno de ellos participa en la fecundación, las células somáticas del nuevo individuo contendrán un número anormal de cromosomas (47 o 45, respectivamente). Estos cuadros llevan el nombre de *aberraciones*

cromosómicas numéricas, de las cuales el *síndrome de Down* es el ejemplo más conocido. En el síndrome de Down las células contienen 47 cromosomas, ya que existen tres versiones del cromosoma 21 en lugar de dos (cap. 17-13).

16-15. En la mujer la meiosis puede durar alrededor de 50 años

Las *células germinativas primitivas* aparecen en el embrión humano a los 20 días de la fecundación, en la pared del saco vitelino. Desde allí emigran a los esbozos gonadales, donde —en el embrión femenino— se dividen y se transforman en ovogonias. Entre el tercero y el séptimo mes de la vida intrauterina las ovogonias entran en meiosis y se convierten en ovocitos I, y permanecen en el período diplonémico desde antes del nacimiento hasta el comienzo de la pubertad. Durante este diplonema tan prolongado los cromosomas experimentan un tipo especial de desenrollamiento, que los asemeja —aunque lejanamente— a los cromosomas plumulados (sección 16-9).

A partir de la pubertad, en cada uno de los ciclos menstruales por venir, varios ovocitos I reanudan la meiosis I, pero ésta llega a su término en uno solo, que se convierte en ovocito II (a veces son dos o más los ovocitos I que completan esta división meiótica). Los restantes ovocitos I degeneran en el ovario.

El ovocito II es liberado por el ovario (*ovulación*) e ingresa en la trompa de Falopio. Aunque ya ha iniciado la segunda división meiótica, ésta finaliza sólo si es fecundado por un espermatozoide, de modo que el óvulo como tal no existe, ya que lo es si se convierte en cigoto. No obstante, suele dársele el nombre de óvulo al ovocito II.

En la recién nacida el número de ovocitos I es de alrededor de un millón. A la edad de 12 años se reducen a 300.000, de los cuales únicamente cerca de 400 alcanzan la madurez total, entre los 12 años y la menopausia. Por tanto, la meiosis en la mujer puede durar alrededor de 50 años, lo cual explica la aparición de una mayor proporción de aberraciones cromosómicas en la descendencia a medida que aumenta la edad materna (cap. 17-13).

16-16. En el varón la meiosis comienza a partir de la pubertad

Tras arribar a los esbozos gonadales, las *células germinativas primitivas* se incorporan a los túbulos seminíferos, donde se convierten en espermatogonias. Estas entran en meiosis a partir de la pubertad y cada una genera, como vimos, cuatro espermatozoides. La profase I dura unos 14 días y la meiosis se completa en alrededor de 24 días. A diferencia de la ovogénesis, la espermatogénesis se prolonga hasta una edad relativamente avanzada.

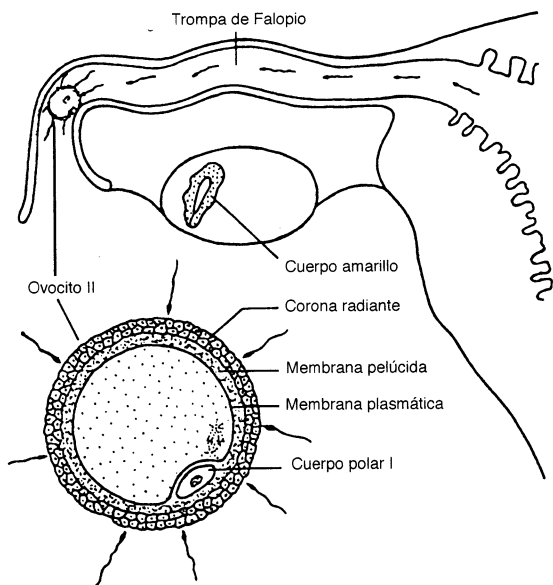


FIG. 16-20. Corte frontal de la trompa de Falopio que muestra el encuentro de los espermatozoides con el ovocito II.

FECUNDACION

16-17. Características de los gametos en el momento de la fecundación

La fertilización del óvulo por el espermatozoide —o *fecundación*— es el paso que inicia el proceso de desarrollo embrionario, y por ese motivo es analizada en los libros de embriología. Aquí solamente ofreceremos una breve reseña de sus aspectos celulares y moleculares.

La fecundación suele producirse en el tercio externo de la trompa de Falopio, adonde arriba el ovocito II —sin haber completado la segunda división meiótica— luego de la ovulación (fig. 16-20).

El ovocito es una célula de gran tamaño, con abundantes *microvellosidades* en su membrana plasmática. Está envuelto por la *membrana pelúcida* y por las células foliculares de la *corona radiante* (fig. 16-20). La membrana pelúcida contiene gran cantidad de glicoproteínas, entre las que se destacan las llamadas ZP1, ZP2 y ZP3 (por *zona pellucida*). Por su lado, las células de la corona radiante se hallan unidas entre sí por un material cementante rico en *ácido hialurónico*.

El espermatozoide posee una cabeza, un cuello y una cola. En la figura 16-21 se muestra un esquema de la cabeza y parte del cuello, con sus respectivos componentes. En la cabeza debe resaltarse la presencia del *acrosoma*, derivado lisosómico que contiene varias clases de enzimas hidrolíticas, dos de las cuales, la *hialuronidasa* y la *acrosina*, desempeñan un importante papel en la fecundación.

Las últimas etapas de la diferenciación de los espermatozoides —llamadas *maduración* y *capacitación*— se cumplen en el epidídimo y en el tracto genital femenino, respectivamente. En su transcurso se afinan, a nivel molecular, ciertos detalles

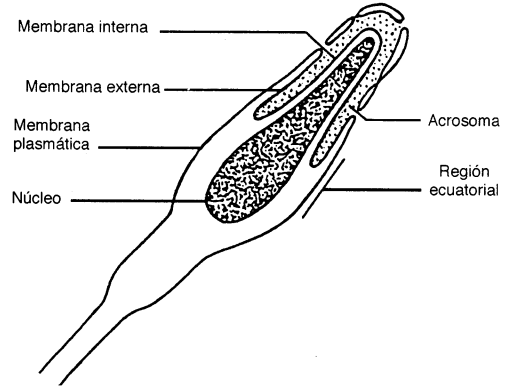


FIG. 16-21. Esquema que muestra algunas estructuras de la cabeza del espermatozoide, particularmente el acrosoma. Obsérvese la formación de poros tras la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosómica externa.

de algunas estructuras de los espermatozoides, imprescindibles para que uno de ellos pueda iniciar la fecundación del ovocito II y el proceso culmine con la formación de la célula huevo o cigoto.

16-18. Los espermatozoides adquieren movimientos de hiperactivación

Entre otros cambios, la capacitación da lugar a la aparición de movimientos muy enérgicos en los espermatozoides, que se distinguen con el nombre de *hiperactivación*. Así, abruptamente, los espermatozoides pasan de un tipo de movimiento suave y lineal a otro vigoroso y errático, intercalado con breves episodios de desplazamientos lineales.

En la figura 16-22 se observan los mecanismos moleculares desencadenantes de la hiperactivación.

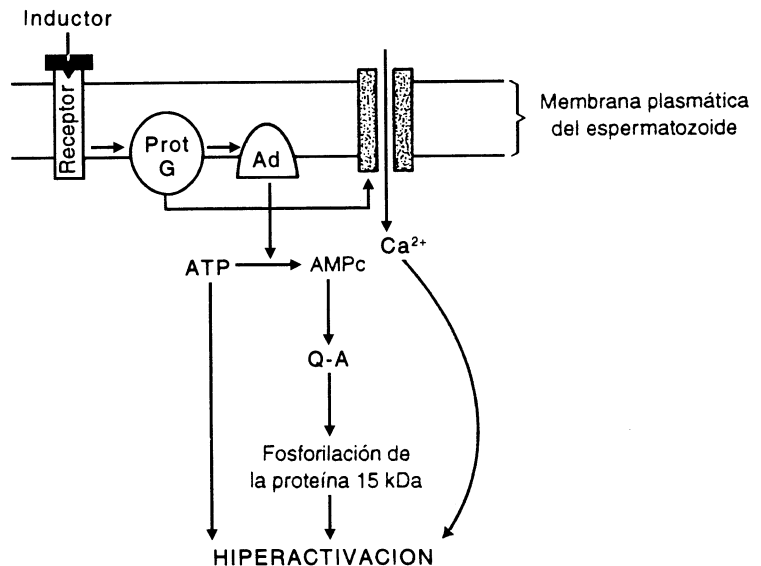


FIG. 16-22. Mecanismos moleculares desencadenantes de la hiperactivación. Ad, adenilato ciclasa.

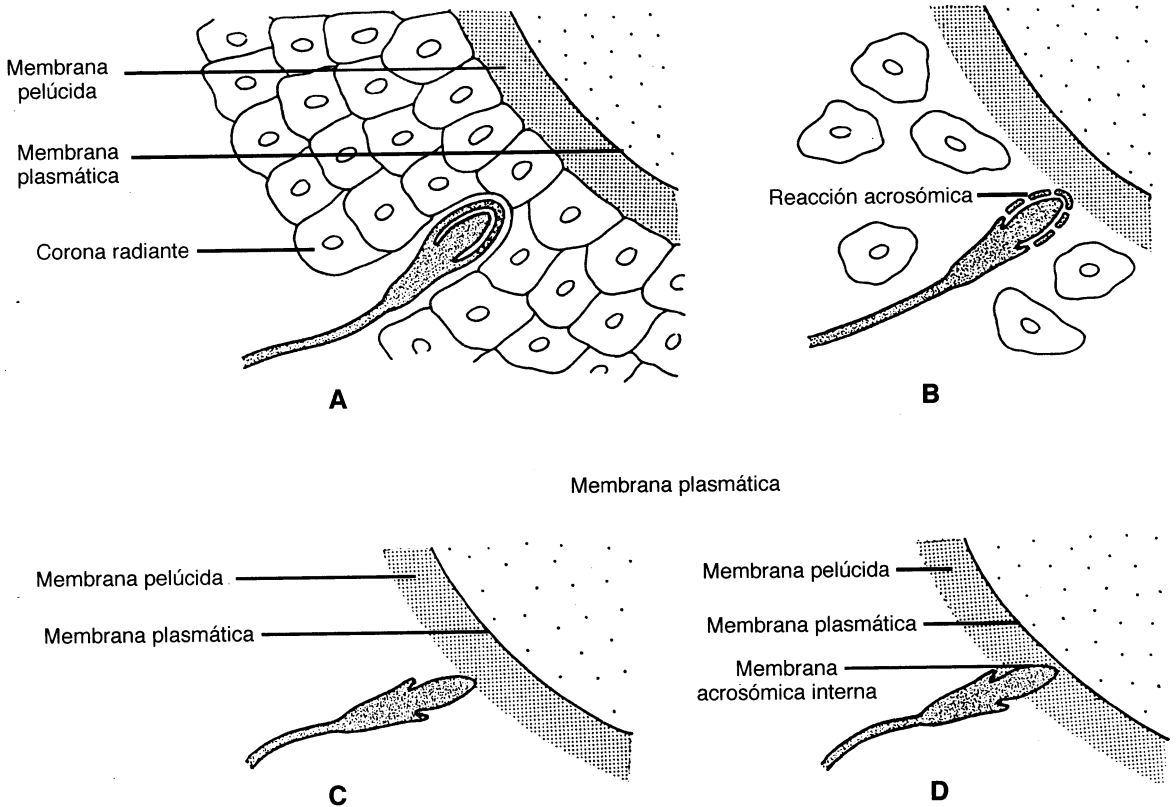


FIG. 16-23. Fases de la fecundación. **A.** Penetración de la corona radiante. **B.** Reacción acrosómica. **C.** Denudación. **D.** Penetración de la membrana pelúcida. **E.** Fusión y reanudación de la segunda división meiótica por parte del ovocito II. **F.** Formación de los pronúcleos masculino y femenino. **G.** Unión de los pronúcleos (singamia). **H.** Metafase de la primera división mitótica (anfimixis). **I.** Comienzo de la primera división de segmentación o clivaje de la célula huevo.

Como se ve, un factor capacitante desconocido interactúa con una proteína receptora situada en la membrana celular del espermatozoide, probablemente a la altura de su cuello, cuyo dominio citosólico activa a una proteína G (cap. 7). A su vez, ésta activa la apertura de un canal iónico de Ca^{2+} e induce la entrada del ion desde el medio extracelular al citosol.

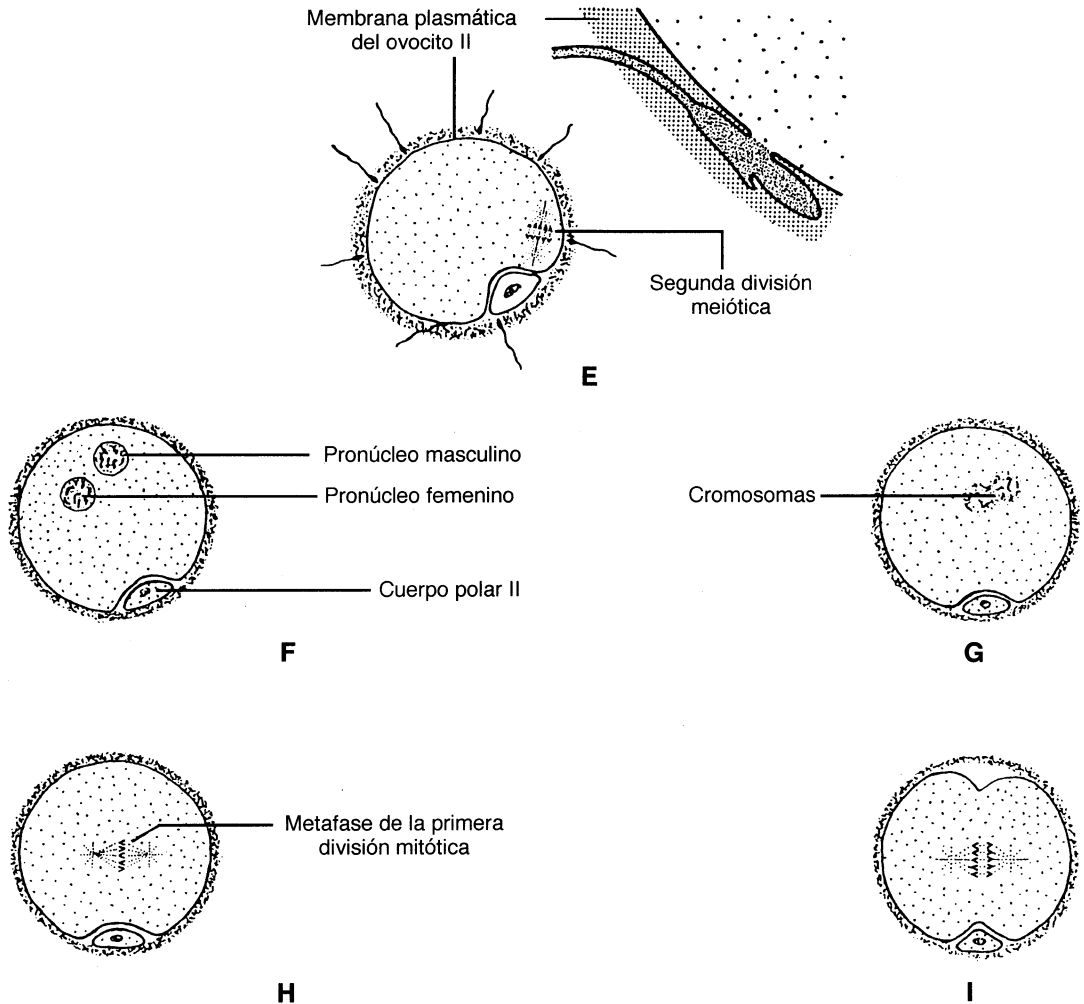
La proteína G también activa a la enzima adenilato ciclasa, lo cual provoca un aumento de AMPc en el citosol y la activación de una quinasa A. A su turno, la quinasa A da lugar a una cadena de reacciones que culmina con la fosforilación de una proteína de 15 kDa asociada a los microtúbulos del axonema.

Finalmente, ante la presencia de ATP —que provee energía—, tanto el Ca^{2+} como la proteína axonémica de 15 kDa activan el deslizamiento de las dineínas entre los microtúbulos, y con ello los movimientos de hiperactivación por parte de la cola del espermatozoide.

16-19. La fecundación se divide en varias fases

La fecundación se inicia a partir del momento en que no más de cien espermatozoides totalmente diferenciados establecen contacto con las células foliculares que envuelven al ovocito II. Para su mejor comprensión, el proceso completo de la fecundación se divide en las siguientes fases (fig. 16-23):

1. Penetración de la corona radiante. Una vez que toma contacto con la corona radiante, cada espermatozoide —con su acrosoma intacto— trata de alcanzar la membrana pelúcida avanzando entre dos células foliculares adyacentes (fig. 16-23, A). Para ello construye una especie de túnel en el cemento que las une, con la ayuda de pequeñas cantidades de *hialuronidasa* que lleva en su membrana plasmática —esta enzima es químicamente idéntica a la contenida en el acrosoma— y la fuerza mecánica derivada de los movimientos de *hiperactivación*. Así, mientras la hialuronidasa digiere lo-



calmente el cemento, los movimientos de hiperactivación hacen avanzar al espermatozoide. Es posible que este mecanismo actúe como un filtro para los espermatozoides y permita que lleguen a la membrana pelúcida solamente los más aptos.

2. **Reacción acrosómica.** Cuando el espermatozoide alcanza la membrana pelúcida y se pone en contacto con ella, se desencadena en su parte frontal un proceso llamado *reacción acrosómica*, que da lugar a múltiples puntos de fusión entre la membrana externa del acrosoma y la membrana plasmática del espermatozoide. Ello genera la formación de poros —por los que se escapan las enzimas acrosómicas— y finalmente la desaparición de ambas membranas (fig. 16-23, B y C). Como consecuencia, en la región frontal del espermatozoide la nueva membrana que queda expuesta al exterior —reemplazando a la desaparecida membrana plasmática— es la *membrana acrosómica interna* (fig. 16-23, C). El mecanismo que pone en marcha la reacción acrosómica es el siguiente:

Una de las glicoproteínas de la membrana pelúcida —la ZP3— interactúa con una *proteína receptora* presente en la membrana plasmática del espermatozoide, cuyo dominio citosólico activa a una proteína G. Esta hace lo propio con la enzima fosfolipasa C, que genera, a partir de fosfatidilinositol difosfato (PIP_2), diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3) (fig. 16-24).

Como se vio en el capítulo 7, el IP_3 abre canales de Ca^{2+} transmembranosos, lo cual provoca la salida del ion desde los depósitos intracelulares al citosol. Además, en el espermatozoide parte del IP_3 se convierte en inositol tetrafosfato (IP_4), que activa un canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática, y ello incrementa aún más la concentración del ion en el citosol. Esta reacción se halla acoplada con la salida de protones (H^+), lo que provoca un aumento del pH citosólico.

Por su lado, el diacilglicerol activa a la quinasa C (dependiente de Ca^{2+}), que desencadena una cascada de fosforilaciones en sucesivas proteínas.

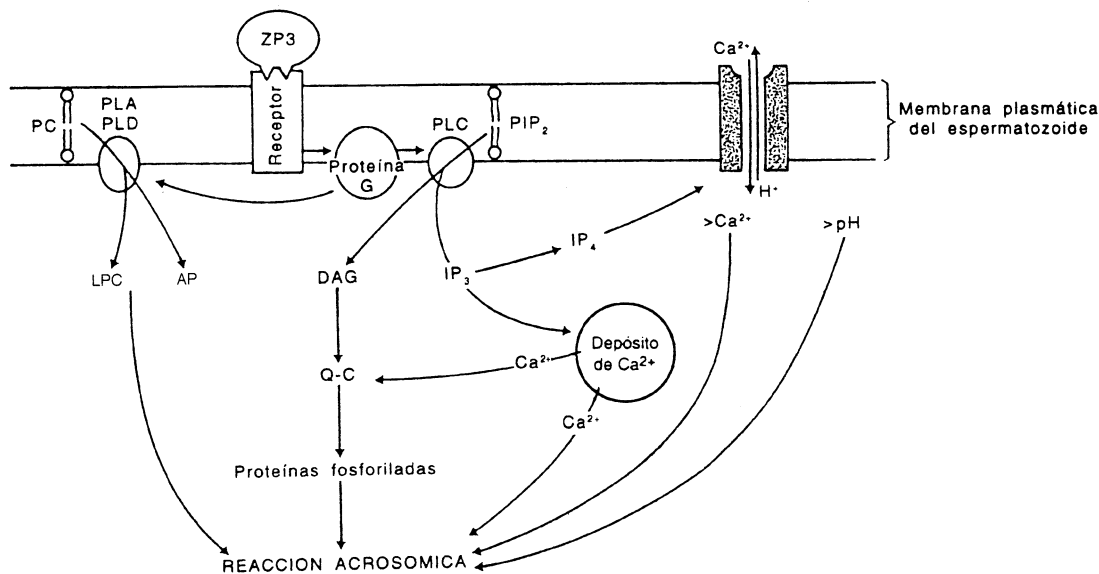


FIG. 16-24. Mecanismos moleculares desencadenantes de la reacción acrosómica.

Aunque no se muestra en la figura 16-24, la proteína G también activa a la enzima adenilato ciclasa. Esta, a partir de ATP, forma AMPc, que activa a la quinasa A, la cual fosforila a varias proteínas que son esenciales para la reacción acrosómica.

La figura 16-24 muestra la activación de las fosfolipasas A y D, que a partir de la fosfatidilcolina generan, respectivamente, lisofosfatidilcolina y ácido fosfatídico (cap. 7).

Finalmente, tanto estos dos factores como los mencionados con anterioridad (aumento de Ca²⁺, aumento del pH, proteínas fosforiladas por vía del diacilglicerol y del AMPc) desencadenan los procesos moleculares *fusogénicos* que dan lugar a las manifestaciones primigenias de la reacción acrosómica: las múltiples fusiones entre la membrana acrosómica externa y la membrana plasmática del espermatozoide que culminan en su desaparición (fig. 16-23, B y C).

Antes que se produzca la reacción acrosómica —al interactuar específicamente la proteína receptora de la membrana plasmática del espermatozoide con la glicoproteína ZP3 de la membrana pelúcida— se genera entre ambos gametos una suerte de *reconocimiento* mutuo, y a partir de éste una fuerte *adhesión*.

A continuación, la reacción acrosómica hace posible el desprendimiento de la corona radiante, la penetración de la membrana pelúcida por parte del espermatozoide y la fusión de la membrana de éste con la del ovocito II.

Los tres últimos procesos se analizarán en los puntos que siguen.

3. **Denudación.** Consiste en el desprendimiento de la *corona radiante* debido a que las células foliculares se dispersan por acción de la *hialuronidasa* liberada desde los acrosomas, ya que esta enzima hidroliza la matriz cementante rica en ácido hialurónico que las mantiene unidas (fig. 16-23, B y C).

4. **Penetración de la membrana pelúcida.** Eliminada la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide —y con ella la proteína receptora para la ZP3—, en su lugar queda expuesta la membrana acrosómica interna, cuya bicapa lipídica posee una proteína receptora llamada *PH20*, que interactúa con otra de las glicoproteínas presentes en la membrana pelúcida, la ZP2. A raíz de ello, los espermatozoides comienzan a atravesar la membrana pelúcida en busca de la membrana plasmática del ovocito II. Lo hacen merced a la acción de otra de las enzimas acrosómicas —la *acrosina*—, la cual, mediante la hidrólisis progresiva del material que compone la membrana pelúcida, va formando en ella un túnel que sigue una trayectoria diagonal (fig. 16-23, D).

No obstante, el pasaje parece ser protagonizado por la fuerza mecánica generada por los movimientos de *hiperactivación* del espermatozoide, adquiridos, como vimos, durante la capacitación. Esa fuerza es del orden de las 3.000 microdinias, suficiente para romper toda clase de uniones covalentes.

Volviendo a la acrosina, ésta no altera la estructura macroscópica de la membrana pelúcida —como cabría esperar de una enzima hidrolítica liberada abruptamente en el medio— debido a que hidroliza solamente el material situado en la inme-

diata vecindad. Esto preserva las uniones entre la PH20 y la ZP2, necesarias para la continuidad del proceso. Tal propiedad deriva del modo de activación de la enzima, puesto que se libera como un precursor, la *proacrosina*, que en forma controlada y en dos pasos da lugar a sendas enzimas hidrolíticas, la α -acrosina y la β -acrosina.

Como vemos, de la misma forma que en la penetración de la corona radiante, el espermatozoide realiza su tarea delicadamente, avanzando sin pausas por el derrotero que él mismo va creando.

5. **Fusión.** Si bien muchos espermatozoides atraviesan la membrana pelúcida, sólo uno establece íntimo contacto con la membrana plasmática del ovocito II, lo cual hace desaparecer sus movimientos de hiperactivación. Pronto las partes de las membranas de las zonas en contacto de ambas células se fusionan y desaparecen, y entre los dos citoplasmas se establece la continuidad que hace posible la entrada del contenido del espermatozoide al interior del ovocito (fig. 16-23, E).

La membrana plasmática del espermatozoide involucrada en esta reacción corresponde al *segmento ecuatorial de la cabeza*, lindante con la ex membrana acrosómica interna (fig. 16-22). La membrana plasmática que aporta el ovocito puede corresponder a cualquier punto de su extensa superficie, con excepción de las zonas aledañas al núcleo (éste se halla detenido en la meiosis II). Recordemos que la membrana plasmática del ovocito presenta numerosas *microvellosidades*, y es precisamente con las membranas de éstas que se fusiona el espermatozoide por su segmento ecuatorial.

Una vez establecida la continuidad entre los citoplasmas, ingresan —en el siguiente orden— la parte posterior de la cabeza, el cuello y la cola del espermatozoide. Luego lo hace la parte anterior de la cabeza (o sea, la envuelta por la que fuera la membrana acrosómica interna), la cual es introducida en el ovocito mediante un proceso que *remeda una fagocitosis*. El material incorporado tiene una evolución dispar. Así, mientras el ADN y el centríolo sobreviven, las mitocondrias y las fibras del axonema no tardan en desaparecer.

La fusión y la ulterior desaparición de las membranas son mediadas por proteínas fusógenas complementarias, presentes en las respectivas bicapas lipídicas. Se han descripto varias proteínas en el segmento ecuatorial del espermatozoide, por ejemplo, una proteína de 37 kDa en el ratón y las llamadas DE y PH30 en la rata y el cobayo, respectivamente. La PH30 está compuesta por dos unidades transmembranosas, una de las cuales liga a la PH30 con la proteína complementaria del ovocito mientras que la otra es responsable de la actividad fusogénica que hace desaparecer a las membranas unidas.

Poco se sabe sobre las proteínas fusógenas pertenecientes a la membrana plasmática del ovocito, aunque se sospecha que estarían ausentes en la zona aledaña al núcleo, donde no existen microvellosidades.

6. **Bloqueo de la polispermia.** Debe fusionarse con el ovocito un solo espermatozoide. Para que esto se logre, tras la fusión se producen algunos cambios en distintas estructuras del ovocito, a fin de neutralizar la entrada de nuevos espermatozoides y evitar con ello la polispermia. El origen de tales cambios se encuentra en la denominada *reacción cortical*, que consiste en la exocitosis de diversas enzimas contenidas en múltiples vesículas de secreción —los llamados *gránulos corticales*— que la célula huevo posee en su corteza. Estos gránulos son generados en el complejo de Golgi y transportados hacia la zona periférica del ovocito por medio de dineínas acopladas a microtúbulos.

Entre las enzimas expulsadas desde los gránulos corticales se encuentra una proteasa que modifica a la ZP3 e hidroliza a la ZP2. Tales cambios alteran la estructura de la membrana pelúcida, lo que provoca la inmovilización y ulterior expulsión de los espermatozoides atrapados en ella.

Otro impedimento para la polispermia reside en la propia membrana del ovocito, que pierde la capacidad para fusionarse con las membranas de los nuevos espermatozoides que se le acercan. Esa imposibilidad dependería de la presencia de algunos componentes aportados por las membranas de los gránulos corticales, que se integran a la membrana plasmática del ovocito al producirse la exocitosis.

La exocitosis de los gránulos corticales se produce como consecuencia de un aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol. Como muestra la figura 16-25, este aumento es inducido por el IP_3 , que libera Ca^{2+} de los depósitos citoplasmáticos. Obsérvese que el proceso se desencadena en el momento en que se produce la fusión, y que el inductor que activa al receptor de la membrana plasmática del ovocito es una proteína perteneciente a la membrana plasmática del espermatozoide. El dominio citosólico del receptor activa a una proteína G, que hace lo propio con la fosfolipasa C. Como es habitual, esta enzima actúa sobre el PIP_2 para generar diacilglicerol y el citado IP_3 . En el próximo punto veremos el significado funcional del diacilglicerol.

El aumento del Ca^{2+} en el citosol comienza a producirse a los 10 segundos de iniciada la fusión de los gametos, y la exocitosis de los gránulos se desencadena en menos de 2 minutos. Poco se sabe sobre los procesos fusogénicos que llevan a la integración —y por ende a la fusión— de la membrana de los gránulos corticales con la membrana plasmática del ovocito.

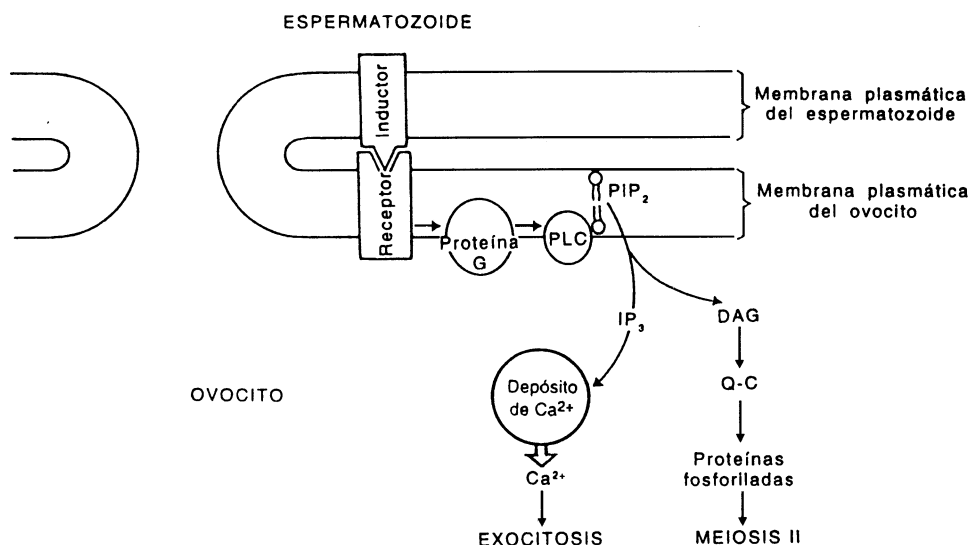


FIG. 16-25. Mecanismos moleculares desencadenantes de la reacción cortical y de la reanudación de la segunda división meiótica por parte del ovocito II.

7. **Reasunción de la segunda división meiótica por parte del ovocito II.** Simultáneamente con las reacciones que dan lugar al bloqueo de la polispermia, el ovocito II reanuda su meiosis, cuya culminación genera dos núcleos haploides, el del óvulo —ya es la célula huevo— y el del cuerpo polar II (fig. 16-23, E y F).

Como se indica en la figura 16-25, el diacilglicerol citado en el punto anterior desencadena la reasunción de la meiosis II, ya que, al activar a la quinasa C, ésta fosforila a las proteínas que hacen posible ese proceso.

8. **Formación de los pronúcleos masculino y femenino.** El núcleo haploide del espermatozoide recibe el nombre de *pronúcleo masculino*, y el del óvulo —haploide también—, el de *pronúcleo femenino* (fig. 16-23, F). Al tiempo que sus cromosomas se desenrollan y sus ADN se replican, ambos pronúcleos se tornan esféricos y se dirigen a la región central de la célula huevo.

La descondensación de los cromosomas en el pronúcleo masculino merece una consideración especial, ya que en los espermatozoides el ADN no se halla asociado a histonas sino a otra clase de proteínas, llamadas *protaminas*, que compactan al ADN mucho más que las histonas. Cuando el espermatozoide ingresa al ovocito, las protaminas son reemplazadas por histonas en menos de 5 minutos mediante un proceso en el que participan proteínas denominadas *nucleoplasminas*.

9. **Singamia y anfimixis.** Los pronúcleos se colocan uno muy cerca del otro en la región central de la célula huevo y pierden sus envolturas (*singamia*) (fig. 16-23, G). Entre tanto, los cromosomas

—ya duplicados— se vuelven a condensar y se disponen en el plano ecuatorial de la célula, como en una metafase mitótica común (*anfimixis*) (fig. 16-23, H). Desde los centrosomas, en los polos de la célula surgen las fibras del huso mitótico, pudiéndose observar un par de centriolos en la matriz de cada centrosoma. Estos dos pares de centriolos derivan del centriolo aportado por el espermatozoide en el momento de la fusión de los gametos, para lo cual ha sido necesario que se duplicara, y que los centriolos hijos se volvieran a duplicar. Este momento representa el fin de la fecundación; con él se inicia la primera división de segmentación de la célula huevo, es decir, el desarrollo embrionario (fig. 16-23, I).

BIBLIOGRAFIA

- Blobel C. P. et al. (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356:248.
- Burks D. J., Carballada R., Moore H. D. M. and Saling P. M. (1995) Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science* 269:83.
- Callan G. H. (1969) Biochemical activities of chromosomes during the prophase of meiosis. In: *Handbook of Molecular Cytology*. North-Holland Publishing, Amsterdam.
- Carpenter A. T. C. (1975) Electron microscopy of meiosis in *D. melanogaster* females. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3186.
- Carpenter A. T. C. (1979) Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination-defective females of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 75:259.
- Chandley A. C. (1988) Meiosis in man. *Trends Genet.* 4:79.
- Chandley A. C., Hotta Y. and Stern H. (1977) Biochemical analysis of meiosis in the male mouse. *Chromosoma* 62: 243, 255.

- Daneholt B. (1975) Transcription in polytene chromosomes. *Cell* 4:1.
- Dressler D. and Potter H. (1982) Molecular mechanism of genetic recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 51:727.
- Gall J. G., Díaz M. O., Stephenson E. C. and Mahon K. A. (1983) The transcription unit of Lampbrush chromosomes. In: *Gene Structure and Regulation in Development*. Alan P. Lyss Inc., New York.
- Garbers D. L. (1989) Molecular basis of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* 58:719.
- Gillies C. B. (1975) Synaptonemal complex and chromosome structure. *Annu. Rev. Genet.* 9:91.
- Hib J. (1994) *Embriología Médica*. Interamericana/McGraw-Hill Inc., México D. F.
- Messelsohn M. S. and Radding C. M. (1975) A general model for genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:358.
- Moens P. B. (1978) Ultrastructural studies of chiasma distribution. *Annu. Rev. Genet.* 12:433.
- Moens P. B. (1987) *Meiosis*. Academic Press, New York.
- Moses M. J. (1968) Synaptonemal complex. *Annu. Rev. Genet.* 2:363.
- Moses M. (1977) Synaptonemal complex karyotyping: I, II and III. *Chromosoma* 60:99, 127, 345.
- Moses M., Counce D. and Pulson D. (1975) Synaptonemal complex complement of man in spreads of spermatocytes. *Science* 187:363.
- Murray A. W. and Szostak J. W. (1985) Chromosome segregation in mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1:289.
- Riley R. and Flavell R. B. (1977) A first view of the meiotic process. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 277:191.
- Roeder G. S. (1990) Chromosome synapsis and genetic recombination: their roles in meiotic chromosome segregation. *Trends Genet.* 6:385.
- Sathananthan A. H. et al. (1991) Centrioles in the beginning of human development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4806.
- Solari A. J. (1974) The behavior of the XY pair in mammals. *Int. Rev. Cytol.* 38:273.
- Solari A. J. (1980) Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* 81:315.
- Sotelo J. R. (1969) Ultrastructure of chromosomes at meiosis. In: *Handbook of Molecular Cytology*. North-Holland Publishing, Amsterdam.
- Stern H. and Hotta Y. (1977) Biochemistry of meiosis. *Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 277:277.
- Stick R. and Schwartz H. (1982) The disappearance of the nuclear lamina during spermatogenesis. *Cell Differentiation* 11:235.
- Stick R. and Schwartz H. (1983) Disappearance and reformation of the nuclear lamina during specific stages of meiosis in oocytes. *Cell* 33:949.
- Wassarman P. M. (1987) Early events in mammalian fertilization. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3:109.
- Wassarman P. M. (1992) Mouse gamete adhesion molecules. *Biol. Reprod.* 46:186.
- Wassarman P. M. and Mortillo S. (1991) Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *Int. Rev. Cytol.* 130:85.
- West S. C. (1992) Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 61:603.
- Westgaard M. and von Wettstein D. (1972) The synaptonemal complex. *Annu. Rev. Genet.* 6:71.
- Yanagimachi R. (1994) Mammalian fertilization. In: *Physiology of Reproduction*, 2nd Ed. Raven Press, New York.
- Zickler D. (1977) The synaptonemal complex and recombination nodules. *Chromosoma* 61:289.

17/Citogenética

Eduardo De Robertis y José Hib

17-1. La unión de la biología celular con la genética dio origen a la citogenética

En el capítulo 1-5 mencionamos los descubrimientos fundamentales que permitieron establecer la unión entre la biología celular y la genética, los cuales dieron por resultado la *citogenética*. Esta disciplina se ocupa de las bases cromosómicas y moleculares que explican los fenómenos de la herencia y de importantes problemas aplicados a la medicina, la ganadería y la agricultura. En este capítulo consideraremos algunos de los conocimientos de la citogenética. Sin embargo, puesto que estos y otros temas relacionados —como variación, mutación, filogenia, ontogenia y evolución de los organismos— pertenecen a los textos de genética, aquí nos ocuparemos sólo de los que conciernen a la biología celular, y en especial a la relación entre los cromosomas y la herencia.

El principal objetivo de este capítulo es ofrecer un concepto general de las bases cromosómicas sobre las cuales se asientan los principios de la herencia descubiertos por Mendel, Morgan y otros. Una parte importante será dedicada al estudio del ligamiento y de la recombinación de los genes. Consideraremos también, en forma concisa, las diversas aberraciones cromosómicas no sólo desde el punto de vista celular, sino también las que pueden producirse en la especie humana (no nos ocuparemos aquí de las mutaciones génicas, que fueron estudiadas en el capítulo 14-14). Finalmente, se describirá el papel que desempeñan los cromosomas en la evolución de las especies.

LEYES DE LA HERENCIA MENDELIANA

17-2. Mendel descubrió las leyes que llevan su nombre en el año 1865

Las bases que rigen la transmisión de los caracteres hereditarios deben buscarse en el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis y en

las consecuencias genéticas de este tipo de división (cap. 16-14). Sin embargo, cuando en 1865 Gregorio Mendel descubrió las leyes fundamentales de la herencia nada se sabía sobre los cromosomas y la meiosis. Sus descubrimientos son el resultado de experimentos de cruzamiento de plantas, analizados en forma cuantitativa aplicando un pensamiento abstracto genial.

Mendel realizó cruzamientos entre arvejas (*Pisum sativum*) que tenían pares de características diferentes y contrastantes. Por ejemplo, utilizó plantas con flores blancas y rojas, con semillas lisas y rugosas, o amarillas y verdes, de tallos altos y bajos, etc. Después de los primeros cruzamientos, observó los híbridos resultantes en la *primera generación filial* (F_1). Luego cruzó los híbridos F_1 entre sí y estudió los resultados en la *segunda generación filial* (F_2).

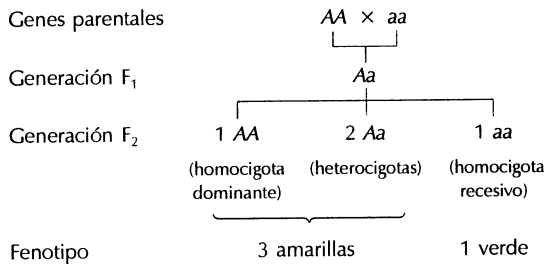
17-3. La ley de la segregación enuncia que los genes se distribuyen sin mezclarse

En un cruzamiento realizado entre *progenitores* (P) con semillas amarillas y verdes, encontró, en la primera generación, que todos los híbridos tenían semillas amarillas y, por lo tanto, sólo la característica de uno de los padres. En el segundo cruzamiento (F_2), las plantas presentaban las características de sus antepasados, con una proporción del 75% para las semillas amarillas y del 25% para las verdes, o sea, en una relación 3:1.

Mendel sostuvo que el color de las semillas era controlado por un “factor” que se transmitía a la descendencia por medio de los gametos. Este “factor” —conocido ahora como gen— podía transmitirse sin mezclarse con otros genes. Mendel enunció que el gen era susceptible de separarse en el híbrido para entrar en gametos diferentes y distribuirse en la descendencia de los híbridos. A causa de ello, a este principio se lo denominó *ley de la segregación* de los genes. Posteriormente observó que las plantas con semillas amarillas en la F_2 po-

seían diferentes constituciones genéticas. Un tercio de este grupo siempre daba semillas amarillas en la generación F_3 , pero los otros dos tercios originaban plantas con semillas amarillas y verdes en la proporción 3:1. El 25% de las plantas de la F_2 con semillas verdes, cuando se cruzaban entre sí, producían siempre semillas verdes en la generación F_3 .

Ello demuestra que existen dos líneas puras para ese carácter. Si representamos por medio de letras a los genes en los cruzamientos, designando con la A al gen para el carácter amarillo y con la a al gen para el carácter verde, tendremos el siguiente resultado:



En la primera generación (F_1) se hallan presentes ambos genes —A y a—, pero sólo A produce el carácter visible (amarillo), porque es *dominante*. El gen a permanece oculto y se denomina *recesivo*. En el híbrido F_1 , los dos genes se separan y pasan a gametos diferentes. La mitad de los gametos llevará el gen A y la otra mitad el gen a. Como cada individuo produce dos tipos de gametos en cada sexo, existen tres combinaciones posibles en la F_2 . Esto da como resultado la relación 1:2:1, ya que el 25% corresponde a plantas AA con semillas amarillas híbridas y 25% a plantas aa con semillas verdes puras.

Ahora es posible explicar los resultados de Mendel sobre la base del comportamiento de los cromosomas y de los genes. Estos se encuentran de a pares, denominados *alelos*. En cada cromosoma homólogo existe un gen en un lugar particular, el *locus* (plural, *loci*). En el caso ilustrado en la figura 17-1, el ratón gris tiene dos genes, uno para cada homólogo. Puesto que los dos homólogos se separan en la meiosis, los dos genes GG dominantes deben también separarse para pasar a los gametos. En el ratón blanco, el mecanismo es similar para los genes recesivos gg. En el híbrido F_1 , un cromosoma lleva el gen G y el cromosoma homólogo el gen g. Cuando se cruzan los híbridos, los gametos se unen en las combinaciones que muestra el método del tablero de damas ilustrado en la figura 17-1. Los individuos que tienen ambos alelos similares (GG o gg) se denominan *homocigotos*, y los que tienen alelos diferentes (Gg), *heterocigotos*.

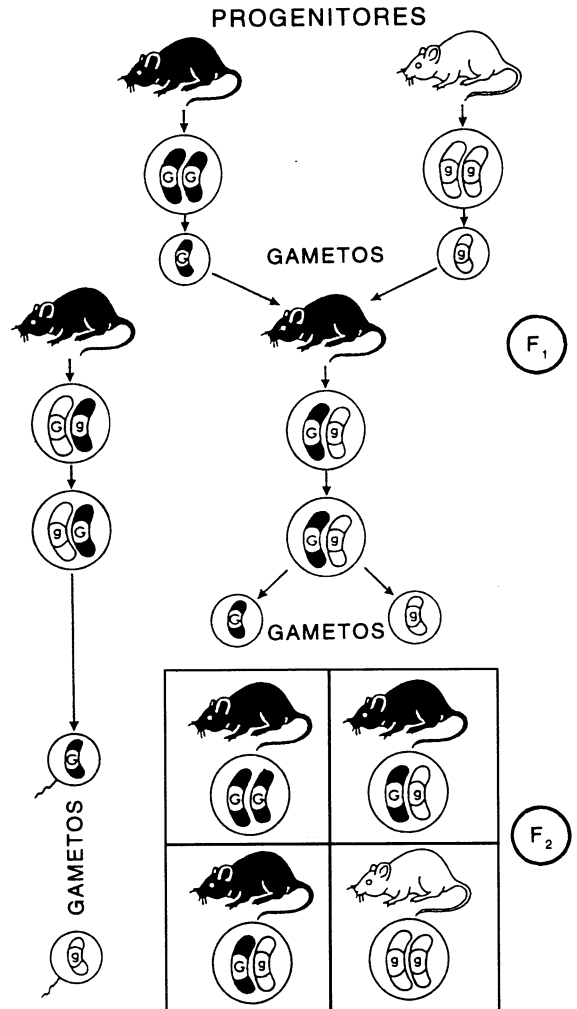


FIG. 17-1. Cruza monohíbrida entre un ratón gris (dominante) y uno blanco (recesivo). Se indica el paralelismo entre la distribución de los genes y los cromosomas, lo mismo que los genotipos resultantes en las generaciones F_1 y F_2 .

Genotipo y fenotipo. En 1911 se propuso el término *genotipo* para la constitución genética y *fenotipo* para las características visibles del individuo. Por ejemplo, en el caso de las semillas analizado anteriormente, existen dos fenotipos en la F_2 : el color amarillo y el color verde, en la proporción 3:1, respectivamente. Sin embargo, de acuerdo con la constitución genética hay tres genotipos: 1 AA, 2 Aa y 1 aa. Esto significa que existen dos proporciones mendelianas, la fenotípica (3:1) y la genotípica (1:2:1). El concepto de fenotipo se extiende a todas las características que constituyen expresiones de los genes, tanto a las externas y visibles (por ejemplo, el color de la piel, el color de los ojos, etc.) como a las que no son detectadas mediante la observación directa (por ejemplo, las

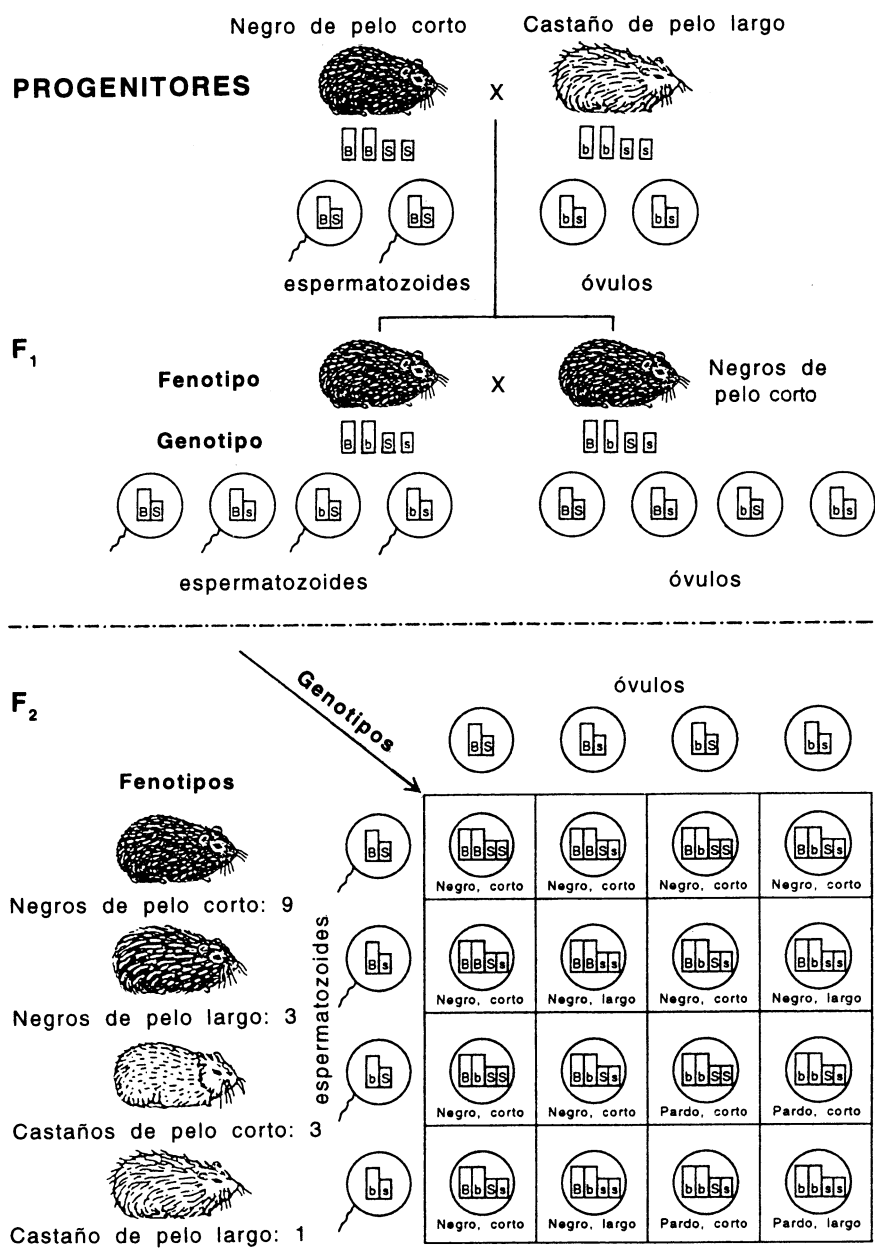


FIG. 17-2. Cruzamiento de un cobayo de pelo negro y corto (rasgos dominantes) con otro de pelo castaño y largo (rasgos recesivos). Obsérvese cómo los genes se segregan independientemente. (De C. A. Villée, 1972.)

distintas clases de hemoglobina, los grupos sanguíneos, etc.).

Si se cruzan ciertas plantas que tienen flores rojas y blancas, como la *Mirabilis jalapa*, es posible encontrar en la F₂ tres fenotipos y no dos: flores rojas, blancas y rosadas, que corresponden a los tres genotipos. Estos casos de herencia intermedia se deben a que la dominancia es incompleta. En estas

situaciones existe, por lo tanto, *codominancia*. Así, no siempre se cumple la regla de la dominancia y la recesividad. La dominancia es completa en la mayoría de los casos, pero en otros es incompleta. En estos últimos se da un fenotipo con características intermedias respecto de los fenotipos de los progenitores, aunque sin que se mezclen los genes alelos.

17-4. La ley de la distribución independiente enuncia que los genes que están en cromosomas diferentes se distribuyen en forma independiente durante la meiosis

Mientras el principio de la segregación se aplica al comportamiento de un solo par de genes, la *ley de la distribución independiente* describe el comportamiento simultáneo de dos o más pares de genes localizados en diferentes pares de cromosomas. Los genes que están en cromosomas separados se distribuyen independientemente durante la meiosis y la descendencia que resulta es híbrida en dos loci.

La figura 17-2 muestra el cruzamiento entre un cobayo oscuro de pelo corto (*BBSS*) y otro castaño de pelo largo (*bbss*). El animal *BBSS* produce sólo gametos *BS* y el *bbss* solamente gametos *bs*. En la generación F_1 , la descendencia es heterocigota para el color y la longitud del pelo. Fenotípicamente, son todos oscuros y de pelo corto.

Cuando dos de los dihíbridos de la F_1 se aparean entre sí, como cada uno forma cuatro tipos de gametos (*BS*, *Bs*, *bS* y *bs*), al producirse la fecundación se originan en los cigotos 16 combinaciones diferentes. Nueve individuos de la F_2 son de pelo oscuro y corto, tres de pelo oscuro y largo, tres de pelo castaño y corto, y uno de pelo castaño y largo. Esta relación fenotípica de 9:3:3:1 es característica del cruzamiento de dos pares de genes.

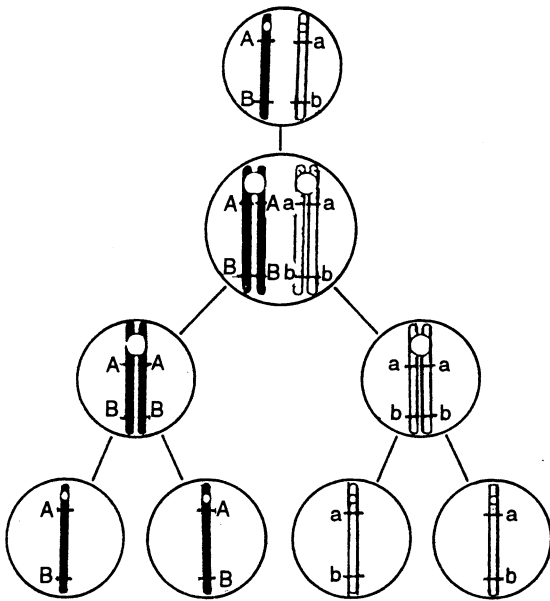


FIG. 17-3. Segregación de dos pares de genes (*AB* y *ab*) localizados en sendos cromosomas homólogos. Dado que no ha ocurrido recombinación génica durante la meiosis, se forman dos clases de gametos diferentes: *AB* y *ab*.

17-5. Se producen ligamientos entre los genes cuando están en un mismo cromosoma

Los ejemplos mencionados de cruzamientos genéticos partían de la base de que durante la meiosis los cromosomas, y también los genes, se distribuyen al azar (cap. 16-14). Empero, cuando se hizo un estudio semejante en la mosca *Drosophila melanogaster*, se vio que la ley de la distribución independiente no tenía aplicación universal. En los cruzamientos de dos o más pares de alelos existe una acentuada tendencia por parte de éstos a quedar ligados, de modo que se produce una proporción de combinaciones diferente de la esperada.

La *Drosophila* posee sólo cuatro pares de cromosomas, lo que eleva la posibilidad de que los genes se hallen en un mismo cromosoma. Si dos pares de genes (*A* y *B* o *a* y *b*) se localizan en el mismo cromosoma, se obtienen, para esos genes, dos clases de gametos: *AB* o *ab*. La coexistencia de dos o más genes en el mismo cromosoma se denomina *ligamiento*. La figura 17-3 ilustra el mecanismo de la meiosis y la formación de gametos en estos casos.

17-6. El ligamiento puede romperse debido a la recombinación genética

Estudios posteriores demostraron que el ligamiento no es absoluto y que se *rompe* con relativa frecuencia. Esto se ilustra en la figura 17-4, en la

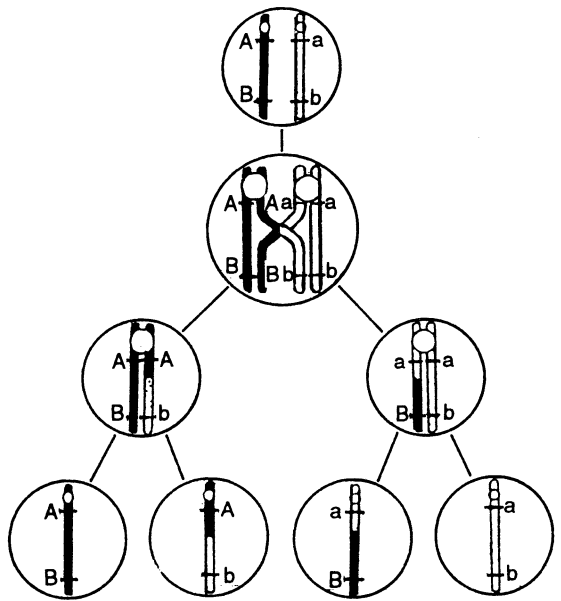


FIG. 17-4. Segregación de dos pares de genes (*AB* y *ab*) localizados en sendos cromosomas homólogos. Como se ha producido recombinación génica durante la meiosis, se forman cuatro clases de gametos diferentes: *AB*, *Ab*, *aB* y *ab*.

cual se produjo una *recombinación* entre los genes A y B durante la meiosis. Así, se han formado cuatro clases de gametos, en dos de los cuales los cromosomas han sufrido recombinación. Es evidente que por el intercambio de segmentos entre las cromátidas homólogas se ha roto el ligamiento.

La frecuencia de recombinación entre dos genes ligados depende de la distancia que los separa en el cromosoma. Cuando se hallan próximos entre sí, la probabilidad de que ocurra una recombinación es menor que si estuvieran más apartados. Más aún, las proporciones de ligamientos permiten estimar la distancia entre los genes y, de esa forma, construir un mapa que indique la posición relativa de cada gen a lo largo del cromosoma.

En el capítulo anterior vimos que la recombinación genética ocurre entre las moléculas de ADN y no es visible microscópicamente. Sin embargo, los quiasmas que se observan en el diplonema son una representación de los sitios donde se produjo el intercambio de ADN. Por lo tanto, existe una correlación entre ambos fenómenos: los quiasmas y la recombinación. Precisamente, el número de recombinaciones se estima mediante el recuento de quiasmas meióticos. El denominado *índice de recombinación* se logra sumando al número de bivalentes el número de quiasmas observados en la célula durante el diplonema. En las especies con índice más alto, la posibilidad de recombinaciones es más elevada y ello da lugar a mayores variaciones en la descendencia.

ABERRACIONES CROMOSOMICAS

17-7. Accidentalmente pueden producirse cambios en el cariotipo

El funcionamiento normal del sistema genético se mantiene por la constancia del material hereditario presente en los cromosomas. En el capítulo 10 (10-8 y 10-12) se dijo que las células somáticas tienen un número diploide de cromosomas —dos

juegos haploides de 23 cromosomas cada uno— y se analizó el *cariotipo*.

Accidentalmente pueden producirse cambios en el cariotipo que tienen diversas consecuencias genéticas. Así, los cromosomas pueden modificar su número (conservando una estructura normal) o sufrir alteraciones en sus estructuras. Tales cuadros se denominan, respectivamente, *aberraciones cromosómicas numéricas* y *aberraciones cromosómicas estructurales*.

17-8. En las poliploidías las células contienen múltiplos del número haploide de cromosomas, diferentes del diploide

La tabla 17-1 muestra las dos clases principales de cambios en el número de cromosomas. En las *poliploidías* hay una modificación en el número de conjuntos haploides, pero el cariotipo se presenta equilibrado. En las células *triploides* existen tres conjuntos haploides similares; en las *tetraploides* cuatro; etc. En las células somáticas los casos de poliploidía pueden originarse por la duplicación del número de cromosomas con supresión de la citocinesis, y en los gametos por la no separación de los cromosomas en cualquiera de las dos divisiones meióticas.

17-9. En las aneuploidías está afectado el número diploide de uno de los pares de cromosomas homólogos

En las *aneuploidías* hay ganancia o pérdida de uno o más cromosomas, de modo que el conjunto deja de ser equilibrado. No obstante, como la alteración es cuantitativa, el mensaje genético contenido en cada cromosoma se mantiene intacto, aunque, como se verá más adelante, las aneuploidías pueden causar graves alteraciones en el hombre.

Las aneuploidías se producen por una falla en la separación de los cromosomas homólogos, denominada *no disyunción*. La causa inmediata de la

TABLA 17-1. Fórmulas y complementos cromosómicos en células poliploides y aneuploides

Tipo	Fórmula	Complemento*
Poliploides		
Triplóide	3n	(ABCD) (ABCD) (ABCD)
Tetraplóide	4n	(ABCD) (ABCD) (ABCD) (ABCD)
Aneuploides		
Monosómico	2n - 1	(ABCD) (ABC)
Trisómico	2n + 1	(ABCD) (ABCD) (B)
Tetrasómico	2n + 2	(ABCD) (ABCD) (B) (B)
Doble trisómico	2n + 1 + 1	(ABCD) (ABCD) (AC)
Nulisómico	2n - 2	(ABC) (ABC)

* Con el objeto de simplificar, en este ejemplo se utilizan sólo cuatro cromosomas, llamados A, B, C y D.

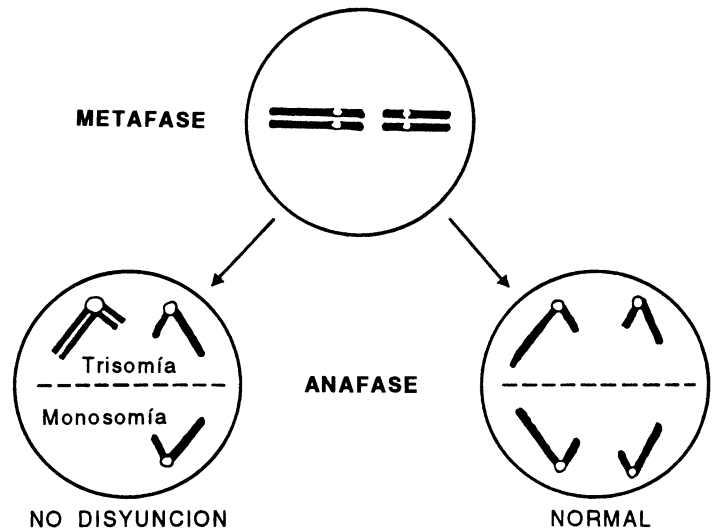


FIG. 17-5. No disyunción mitótica. Metafase normal (arriba). Anafase normal (abajo derecha). Anafase no disyuntiva que da lugar a un núcleo monosómico y otro trisómico (abajo izquierda).

no disyunción es la no separación de una de las cromátidas hermanas en la anafase; así, al arribar la célula a la telofase, esa cromátida permanecerá en una de las células hijas junto con la otra cromátida hermana. Ello da lugar a una línea celular que carece de un cromosoma y a otra que posee un cromosoma de más (fig. 17-5). La no disyunción se produce generalmente en la meiosis, pero también puede ocurrir en la mitosis.

La meiosis no disyuntiva da origen a un gameto aneuploide que, cuando se une a un gameto normal, forma un cigoto portador de una aneuploidía. Si al gameto aneuploide le falta un cromosoma, el cigoto resultará *monosómico*. Si le sobra un cromosoma, el cigoto será *trisómico*. Así, en los individuos monosómicos se produce la pérdida de uno de los cromosomas, mientras que en los trisómicos hay un cromosoma de más (tabla 17-1).

La mitosis no disyuntiva puede ocurrir en la división mitótica que precede a la formación de los gametos o en las células derivadas de la división del cigoto. En el primer caso, los efectos son similares a los que se producen en la meiosis no disyuntiva, pero en el segundo —dado que la no disyunción tiene lugar en los primeros estadios del desarrollo embrionario— se originan *mosaicos*, es decir, individuos que exhiben líneas celulares somáticas con dos o más cariotipos diferentes.

17-10. Existen varias clases de aberraciones cromosómicas estructurales

Las *aberraciones cromosómicas estructurales* deben ser diferenciadas de las mutaciones génicas, en las cuales los cambios se producen a nivel molecular al verse alterado el código genético (cap. 14-14).

Para comprender el mecanismo por el cual se producen las aberraciones cromosómicas estructurales es necesario recordar el concepto de estructura uninémica de los cromosomas (cap. 10-5). De acuerdo con éste, en el período G1 cada cromosoma está compuesto por una sola molécula de ADN. Después de la replicación del ADN (período S), en el período G2 y parte de la mitosis, cada cromosoma contiene dos cromátidas y, en consecuencia, dos moléculas de ADN (fig. 14-3). En las aberraciones cromosómicas estructurales se produce una alteración en la composición o en la organización de uno o más cromosomas. Así, la ruptura de una o de las dos cromátidas puede conducir, según el caso, a la pérdida de un segmento cromosómico —fenómeno denominado *delección* o *deficiencia*—, a la *duplicación* de un segmento, a la *translocación* de segmentos entre cromosomas no homólogos o a la *inversión* de un segmento dentro del propio cromosoma. En todos estos casos es posible detectar los defectos analizando los cromosomas en su estado de máxima compactación (metafase) (cap. 10-13).

Delección. La pérdida de material cromosómico puede ser *terminal* (en un extremo del cromosoma) o *intersticial* (en un segmento intermedio del cromosoma) (fig. 17-6, A). En el primer caso la aberración es el resultado de una sola rotura, y en el segundo, de dos. Usualmente las delecciones son letales en la condición homocigota y esto indica que la mayoría de los genes son imprescindibles para el desarrollo del organismo.

Duplicación. En esta aberración un segmento cromosómico está representado más de una vez en un mismo cromosoma (fig. 17-6, B). Las duplicaciones producen efectos menos graves para los individuos que las delecciones.

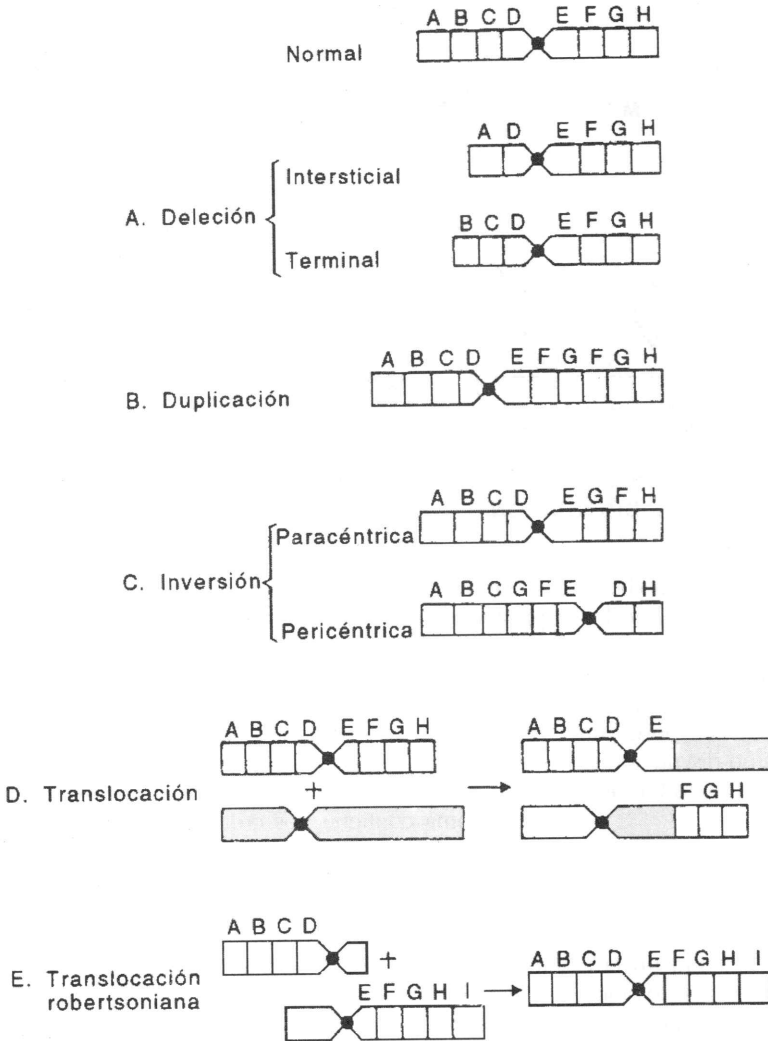


FIG. 17-6. Esquemas que muestran algunas de las aberraciones cromosómicas más frecuentes.

Inversión. Aquí un segmento de un cromosoma se invierte 180°. Las inversiones se denominan *pericéntricas* cuando el segmento afectado incluye al centrómero y *paracéntricas* cuando no lo incluye (fig. 17-6, C).

Translocación. Esta aberración cromosómica se produce como consecuencia de la rotura simultánea de dos cromosomas no homólogos y el ulterior intercambio de los respectivos segmentos entre esos cromosomas (fig. 17-6, D).

Cuando en cada cromosoma la rotura ha tenido lugar al lado del centrómero, ambos cromosomas pueden fusionarse entre sí, lo que da origen a un cromosoma metacéntrico de mayor tamaño (fig. 17-6, E). Este proceso —denominado *translocación robertsoniana*— ha acontecido durante la filogenia de muchas especies, en las cuales han aparecido nuevos cromosomas y el número de éstos se ha reducido.

17-11. Las radiaciones y mutágenos químicos pueden producir roturas en los cromosomas

Como las mutaciones génicas, las aberraciones cromosómicas estructurales pueden producirse en forma espontánea, pero su frecuencia aumenta por efecto de las radiaciones ionizantes (rayos X, rayos β , rayos γ , luz ultravioleta) (fig. 17-7), por la acción de determinados agentes químicos mutágenos o por la de ciertos virus.

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN LA ESPECIE HUMANA

17-12. Las células humanas pueden sufrir aberraciones cromosómicas

Las anomalías cromosómicas más comunes en el hombre están representadas por aneuploidías (monosomías y trisomías) y por aberraciones estruc-

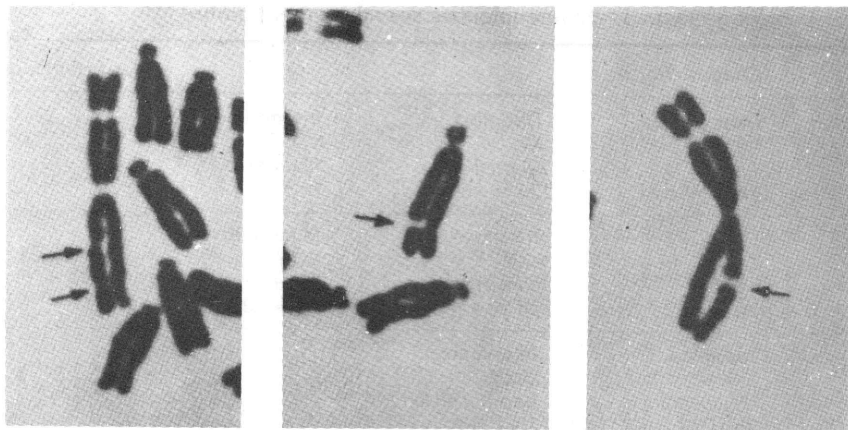


FIG. 17-7. Rupturas (flechas) de cromátidas producidas por radiación. (De H. Evans.)

turales. Tales defectos producen malformaciones congénitas graves, retardo mental y esterilidad, situaciones que actúan como mecanismos selectivos que tienden a eliminar de la población esos graves desequilibrios genéticos. El diagnóstico de las aberraciones cromosómicas puede hacerse antes que el niño haya nacido, entre otras formas, mediante el estudio de unas pocas células fetales obtenidas del líquido amniótico (*amniocentesis*) (fig. 17-8) o de las vellosidades coriónicas (*biopsia*).

17-13. La aneuploidía autosómica más conocida es el mongolismo

Entre las aneuploidías más difundidas se encuentra el *mongolismo* o *síndrome de Down*, en el que existen tres cromosomas del par 21 (trisomía) en lugar de dos. Los afectados presentan un profundo

defecto en el desarrollo del sistema nervioso central, retardo mental y otras malformaciones. Esta aberración es más frecuente a medida que aumenta la edad de la madre (cap. 16-15). No se observan recurrencias familiares.

17-14. Otras aneuploidías se dan en los cromosomas de los pares 18 y 13

En la trisomía del par 18 —llamada *síndrome de Edwards*— el niño es pequeño y débil, su cabeza se halla achatada lateralmente, los pabellones auriculares están mal desarrollados, las manos son cortas y las impresiones digitales son sumamente simples; presenta evidente retraso mental y la muerte ocurre antes del año de vida.

En la trisomía del par 13 —llamada *síndrome de Patau*— aparecen múltiples malformaciones somá-

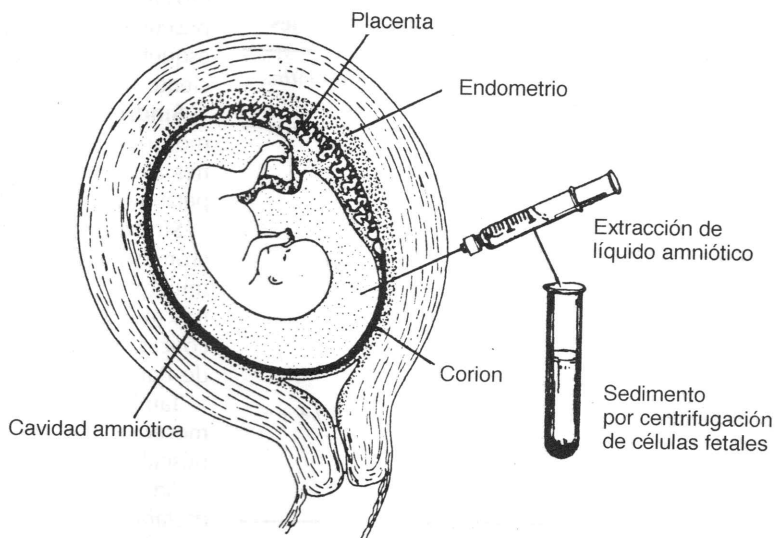


FIG. 17-8. Esquema que ilustra la realización de una amniocentesis, utilizada para extraer células fetales del líquido amniótico, habitualmente entre las semanas decimocuarta y decimosexta de la gestación. Para llegar a la cavidad amniótica la aguja debe atravesar la pared abdominal y la pared del útero.

TABLA 17-2. Aneuploidías sexuales en el hombre

Cuadro clínico			Cromatina sexual
Monosómico X0 <i>Turner</i> 2n = 45	Disómico XY <i>Normal</i> 2n = 46	Trisómico XYY <i>Síndrome XYY</i> 2n = 47	0
Disómico XX <i>Normal</i> 2n = 46	Trisómico XXY <i>Klinefelter</i> 2n = 47	Tetrasómico XXYY <i>Klinefelter</i> 2n = 48	1
Trisómico XXX <i>Metahembra</i> 2n = 47	Tetrasómico XXXX <i>Tipo Klinefelter</i> 2n = 48		2
Tetrasómico XXXX <i>Metahembra</i> 2n = 48	Pentasómico XXXXY <i>Tipo Klinefelter</i> 2n = 49		3
Fenotipo	Femenino	Masculino	Masculino

ticas y retardo mental profundo. La cabeza es pequeña y los ojos a menudo son chicos o están ausentes; también son frecuentes el labio leporino y el paladar hendido. En la mayoría de los casos la muerte se produce poco después del nacimiento.

17-15. Las aneuploidías pueden afectar a los cromosomas sexuales

En la tabla 17-2 se indican las aneuploidías más frecuentes de los cromosomas sexuales, junto con los nombres de los síndromes clínicos y la indicación de la presencia o ausencia de cromatina sexual o corpúsculo de Barr.

TABLA 17-3. Mosaicos cromosómicos sexuales

Síndrome clínico		Cromatina sexual
Hembras		
X0/XY	Turner	–
X0/XXY	Turner	–/+
X0/XXX	Variable	–/++
Machos		
XX/XXY	Klinefelter	+
XY/XXY	Klinefelter	+
XXXY/XXXXY	Gónadas y caracteres sexuales poco desarrollados	++/+++
X0/XY	Hermafrodita	–

Síndrome de Klinefelter. Estos individuos poseen 47 cromosomas (44 autosomas + XXY) y, por lo tanto, cromatina sexual positiva. Son aparentemente normales, excepto por el hecho de que presentan anomalías fenotípicas menores. Tienen testículos pequeños, ginecomastia, tendencia a una talla elevada, obesidad y menor desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. La espermatogénesis no se produce, lo cual determina una esterilidad completa.

Se han descrito varones con 48 cromosomas (44 autosomas + XXXY), con dos corpúsculos de Barr, que muestran características del síndrome de Klinefelter y, además, retardo mental.

También se han detectado pacientes con 49 cromosomas (44 autosomas + XXXXY), con tres corpúsculos de Barr, que presentan extensos defectos esqueléticos, hipogenitalismo extremo y un coeficiente mental considerablemente bajo.

Síndrome XYY. Estos individuos poseen 47 cromosomas (44 autosomas + XYY). Se trata de varones altos, de aspecto normal, con trastornos de la personalidad.

Síndrome XXX. La constitución triple X, con 47 cromosomas (44 autosomas + XXX), se presenta en mujeres con fenotipo prácticamente normal. Algunas muestran retardo mental o características psicóticas. En sus células se observan dos corpúsculos de Barr.

También se han detectado pacientes con 48 cromosomas (44 autosomas + XXXX), con tres corpúsculos de Barr y serio retardo mental.

Ambos cuadros son conocidos con el nombre de *metahembras*.

Síndrome de Turner. En el cariotipo de estos pacientes hay 45 cromosomas (44 autosomas + X) y no se encuentra cromatina sexual. Tienen fenotipo femenino, suelen ser de pequeña estatura, poseen membranas cervicales (pliegues de la piel extendidos desde las mastoides hasta los hombros) y sus órganos sexuales internos son infantiles. El ovario no completa su formación (aparentemente la falta de uno de los cromosomas X determina una atresia ovárica progresiva); a causa de esta disgenesia ovárica no se desarrollan los caracteres sexuales secundarios.

Mosaicos. En los tejidos de estos individuos conviven células con distintos complementos cromosómicos. La tabla 17-3 ilustra los mosaicos de cromosomas sexuales más frecuentes, tanto en varones como en mujeres.

17-16. Existen diversos cuadros producidos por aberraciones cromosómicas estructurales

La aberración cromosómica estructural más común en el hombre es ocasionada por la *translocación* de un segmento de uno de los cromosomas del par 21 a un cromosoma del par 13, 14 o 15 (fig. 17-9). Genera cuadros similares al del *síndrome de Down*, pero menos graves y menos frecuentes (representan el 2% de los casos de mongolismo), y su aparición no guarda relación con el aumento de la edad materna. A veces la presencia del segmento translocado se halla compensada por la falta del mismo segmento en uno de los cromosomas del par 21, caso en el cual los individuos son fenotípicamente normales. Sin embargo, como son portadores de la aberración, pueden transferir la malformación a sus descendientes.

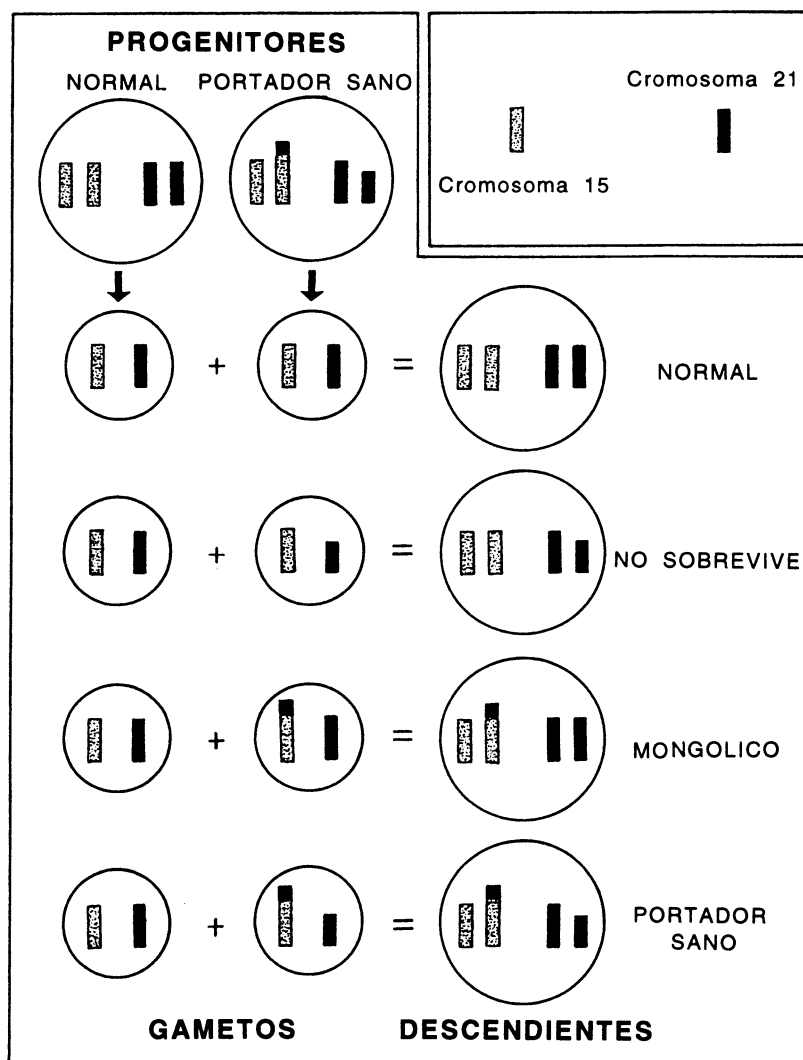


FIG. 17-9. Células somáticas (diploides) y gametos (haploides) de los progenitores cuando en el genotipo de uno de ellos existe una translocación de un segmento de uno de los cromosomas del par 21 en un cromosoma del par 15. A la derecha se muestran las posibles células somáticas (diploides) de los descendientes.

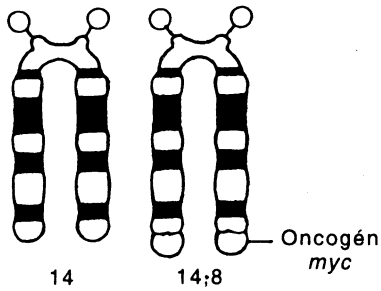


FIG. 17-10. Translocación de un fragmento del cromosoma 8 (que contiene el oncogén *myc*) en el cromosoma 14. El oncogén es activado por el gen que codifica la cadena pesada de las inmunoglobulinas, situado cerca del extremo del cromosoma 14.

El *síndrome del maullido de gato*, generado por una delección en el brazo corto del cromosoma 5, se manifiesta por múltiples malformaciones y un acentuado retraso mental. El niño emite un llanto extraño, semejante a un maullido.

Otros cuadros de aberraciones cromosómicas estructurales se producen por la delección de una parte de uno de los cromosomas X (lo cual genera un cuadro semejante al del *síndrome de Turner*) o por la delección del brazo corto o largo de uno de los cromosomas del par 18 (que produce alteraciones faciales y retraso mental).

17-17. *Ciertos tumores muestran aberraciones cromosómicas en sus células*

Las *células cancerosas* frecuentemente presentan cromosomas rotos, poliploidías y aberraciones cromosómicas estructurales (translocaciones) (cap. 15-29). El caso más conocido es el que se da en la *leucemia mieloide crónica*, en la que aparece el llamado *cromosoma Filadelfia*, producto de una translocación balanceada entre los cromosomas 9 y 22 (cap. 15-30). El *retinoblastoma* se produce por un defecto en ambos alelos del gen *Rb*, lo cual puede deberse a delecciones en el brazo largo de ambos miembros del cromosoma 13 (cap. 15-31). En el *linfoma de Burkitt*, una parte del cromosoma 8 se transloca al cromosoma 14 (fig. 17-10). En algunos *cánceres de pulmón* se ha observado una delección en el cromosoma 3.

PAPEL DESEMPEÑADO POR LOS CROMOSOMAS EN LA EVOLUCION

17-18. *La citogenética impulsó el estudio de la evolución de las especies*

El estudio de la evolución tomó gran impulso gracias al desarrollo de la citogenética, al poderse comparar los genomas de especies emparentadas.

La sistemática también experimentó un progreso considerable por el aporte de la citogenética, pues le ha proporcionado muchos recursos para dilucidar interrelaciones entre diferentes categorías taxonómicas (como se sabe, las familias, géneros y especies se caracterizan por tener sistemas genéticos distintos).

El estudio del cariotipo de diversas especies ha permitido establecer una serie de hechos de gran interés, tanto en el reino animal como en el vegetal. En poblaciones salvajes se demostró que los individuos son, en cierto grado, genéticamente heterocigotos. En algunos casos, los genes, aun cuando son idénticos, están ordenados de manera distinta a causa de alteraciones ocurridas en los segmentos cromosómicos. Estos cambios desempeñaron un papel preponderante en el mecanismo de formación de las especies.

Las organizaciones de los cromosomas y de los cariotipos observadas en los individuos, las especies, los géneros y los grupos sistémicos mayores indican que en la evolución han intervenido diversos mecanismos cromosómicos. Las principales fuentes de variación han sido la aneuploidía y la poliploidía. La poliploidía no es tan importante en el reino animal. Entre los vertebrados, diversas clases de peces tienen distinto número de cromosomas. Los anfibios, en especial los anuros, se caracterizan por la presencia de un número fijo para cada familia. La variación en las aves y en los mamíferos se debe más a cambios en los cromosomas individuales y a mutaciones génicas que a modificaciones en el contenido total del material genético.

17-19. *Se ha estudiado la evolución del cariotipo en los primates*

Muchos de los trabajos sobre la evolución se refieren a la relación citogenética entre el hombre y los grandes monos (chimpancé, gorila, orangután). Dado que el hombre tiene 23 pares de cromosomas y los grandes monos poseen 24 pares, por lo menos una translocación robertsoniana pudo haber tenido lugar en su evolución (sección 17-10). Se cree que el cromosoma 2 del hombre es el resultado de tal translocación a partir de dos cromosomas hallados en los monos. Por otra parte, 13 pares de cromosomas humanos son casi idénticos a otros tantos pares de cromosomas del chimpancé, y en los restantes cromosomas se observan inversiones pericéntricas y adición de material cromosómico. En suma, la evolución de los cromosomas en los primates ha sido consecuencia de fusiones, translocaciones y, fundamentalmente, inversiones pericéntricas de segmentos cromosómicos, todo lo cual permitió seleccionar los genes que dieron origen al *Homo sapiens*.

También el análisis de la secuencia del ADN mitocondrial tuvo un importante impacto en los estudios taxonómicos. Permitió establecer relaciones genealógicas entre especies íntimamente relacionadas, como la humana y las de los monos, y construir el posible árbol evolutivo de esas especies.

BIBLIOGRAFIA

- Brinkley B. R. and Hittelman W. N. (1975) Ultrastructure of mammalian chromosome aberrations. *Int. Rev. Cytol.* 42: 49.
- Bühler E. M. (1980) A synopsis of the human Y chromosome. *Human Genet.* 55:145.
- Comings D. E. (1978) Mechanism of chromosome banding and implications of chromosome structure. *Annu. Rev. Genet.* 12:25.
- Comings D. E. (1980) Prenatal diagnosis and the "new genetics". *Human Genet.* 32:453.
- Darlington G. D. (1978) A diagram of evolution. *Nature* 276: 447.
- de Grouchy J., Turleau C. and Finaz C. (1978) Chromosomal phylogeny in the primates. *Annu. Rev. Genet.* 12:289.
- Dutrillaux B. (1977) New chromosome techniques. In: *Molecular Structure of Human Chromosome*. Academic Press, New York.
- Dutrillaux B. (1979) Chromosomal evolution in primates. *Human Genet.* 48:251.
- Dutrillaux B. (1981) Les chromosomes des primates. *La Recherche* 12:1246.
- Evans H. J. (1967) *Radiation Research*. North-Holland Publishing, Amsterdam.
- Ford C. E. (1977) Twenty years of human cytogenetics. *Hereditas* 86:5.
- Fuchs F. (1980) Genetic amniocentesis. *Sci. Am.* 242:47.
- Gethart E. (1981) Sister chromatid exchange and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Human Genet.* 58:235.
- Greagan R. P. and Ruddle F. H. (1977) New approaches to human gene mapping by somatic cell genetics. In: *Molecular Structure of Human Chromosomes*. Academic Press, New York.
- Hamerton J. L. (1971) *Human Cytogenetics*. Academic Press, New York.
- Harnden D. (1982) Human cytogenetic nomenclature. *Human Genet.* 59:269.
- Harris H. (1975) *The Principles of Human Biochemical Genetics*, 2nd Ed. Elsevier Publishing, Amsterdam.
- Hasold T. J. and Jacobs P. A. (1984) Trisomy in man. *Annu. Rev. Genet.* 18:69.
- Henderson S. A. (1969) Chromosome pairing, chiasmata, and crossing over. In: *Handbook of Molecular Cytology*. North-Holland Publishing, Amsterdam.
- Hook E. B. (1973) Behavioral implication of the human XYY genotype. *Science* 179:139.
- Jeffreys A. J. and Barrie P. A. (1981) Sequence variation of nuclear DNA in man and primates. *Philos. Trans. Royal Soc. (London)* 292:133.
- John B. and Lewis K. R. (1973) The meiotic mechanism. In: *Readings in Genetics and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Jones K. W. (1977) Repetitive DNA in primate evolution. In: *Molecular Structure of Human Chromosomes*. Academic Press, New York.
- Jost A. D. (1970) Development of sexual characteristics. *Sci. J. (London)* 6:67.
- Jukes T. H. (1983) Mitochondrial codes and evolution. *Nature* 301:19.
- Kolata G. (1983) First trimester prenatal diagnosis. *Science* 221:1031.
- Latt S. A. (1981) Sister chromatid exchange formation. *Annu. Rev. Genet.* 15:11.
- Latt S. A. and Darlington G. J. (1982) Prenatal diagnosis. *Cell biological approaches*. In: *Methods in Cell Biology*. Academic Press, New York.
- Latt S. A. and Schreck R. R. (1980) Sister chromatid exchange analysis. *Human Genet.* 32:297.
- Levan A., Levan G. and Mitelman F. (1977) Chromosomes and cancer. *Hereditas* 86:15.
- Lewis K. R. and John B. (1964) The Matter of Mendelian Heredity. J. & A. Churchill, London.
- Lyon M. F. (1972) X-chromosome inactivation and development patterns in mammals. *Biol. Rev.* 47:1.
- McKusick V. A. (1971) The mapping of human chromosomes. *Sci. Am.* 224:104.
- McKusick V. A. and Ruddle F. H. (1977) The status of the gene map of the human chromosomes. *Science* 390: 405.
- Martin G. R. (1982) X-chromosome inactivation in mammals. *Cell* 29:721.
- Olby R. C. (1966) *Origins of Mendelism*. Constable, London.
- Ott J. (1985) *Analysis of Human Genetic Linkage*. University Press, Baltimore.
- Pearson P. L. (1977) Banding patterns, chromosome polymorphism, and primate evolution. In: *Molecular Structure of Human Chromosomes*. Academic Press, New York.
- Puck T. T. and Kao F. T. (1982) Somatic cell genetics and its application to medicine. *Annu. Rev. Genet.* 16:225.
- Rowley J. D. (1980) Chromosome abnormalities in human leukemia. *Annu. Rev. Genet.* 14:17.
- Rowley J. D. (1983) Human oncogene locations and chromosome aberrations. *Nature* 301:290.
- Sánchez O. and Yunis J. J. (1977) New chromosome techniques and their medical application. In: *New Chromosome Syndromes*. Academic Press, New York.
- Seeberg E. (1982) *Chromosome Damage and Repair*. Plenum Press, New York.
- Sing L., Purdom I. F. and Jones K. W. (1980) Sex chromosome associated satellite DNA. *Evolution and conservation*. *Chromosoma* 79:137.
- Stahl F. W. (1969) *The Mechanics of Inheritance*, 2nd Ed. Prentice-Hall, New Jersey.
- Stern C. and Sherwood E. R. (1966) *The Origin of Genetics: A Mendel Source Book*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Suzuki D. T., Griffiths A. J. F., Miller J. H. and Lewontin R. C. (1989) *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Swanson C. P., Metz T. and Young W. J. (1981) *Cytogenetics: The Chromosome in Division, Inheritance, and Evolution*. Prentice-Hall, New Jersey.
- Taylor J. H. (1967) Meiosis. In: *Encyclopaedia of Plant Physiology*. Springer-Verlag, Berlin.
- von Wettstein D. et al. (1984) The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu. Rev. Genet.* 18:331.
- Wolff S. (1977) Sister chromatid exchange. *Annu. Rev. Genet.* 11:183.
- Yunis J. J., Tsai M. Y. and Willey A. M. (1977) *Molecular Organization and Function of the Human Genome*. Academic Press, New York.
- Yunis J. J. and Prakash O. (1982) The origin of man: A chromosomal pictorial legacy. *Science* 215:1525.

18 / Diferenciación celular. Muerte celular

Eduardo De Robertis y José Hib

DIFERENCIACION CELULAR

18-1. Introducción

En la primera parte de este capítulo, después de exponer las características generales de las diferenciaciones celulares, analizaremos los posibles mecanismos que generan las diferencias iniciales entre las células de los embriones más jóvenes. Posteriormente veremos cómo se establece el plan corporal. Luego estudiaremos los mecanismos que dan lugar a las diferenciaciones celulares en las etapas si-

guientes del desarrollo y el modo como se mantienen. Finalmente incursionaremos en el estudio de los genes responsables del establecimiento del plan corporal en la mosca *Drosophila melanogaster* y sus posibles equivalentes en los vertebrados.

18-2. Características generales de la diferenciación celular

En términos moleculares, diferenciación celular significa actividad génica variada entre las células de un mismo organismo. La especialización de las células implica la síntesis de proteínas específicas (como la hemoglobina en los eritrocitos, los anticuerpos en los linfocitos, los neurofilamentos en las neuronas, etc.), de modo que en cada tipo celular se expresa un gen singular, distinto de los genes expresados en los otros tipos celulares (en realidad, las diferencias no son determinadas por un solo gen sino por conjuntos de genes distintos).

Muchas de las actuales investigaciones en biología molecular están dirigidas a interpretar la manera como se expresan los genes en forma específica en las diferentes clases de células. En el capítulo 12 estudiamos los mecanismos implicados en la regulación génica en las células eucariotas.

Obviamente, no todos los genes que se expresan en cada clase de célula lo hacen en forma exclusiva. Algunos, los denominados *genes de mantenimiento*, se hallan activos virtualmente en todos los tipos celulares. Son ejemplos de genes de mantenimiento los necesarios para la construcción de las membranas celulares, los ribosomas, las mitocondrias, las enzimas glicolíticas, etc., es decir, los componentes comunes a todas las células. En cambio, los genes que se expresan en forma diferencial (como los de la hemoglobina, los que codifican anticuerpos, etc.) dan lugar a las denominadas —en la jerga de la biología celular— *funciones de lujo*.

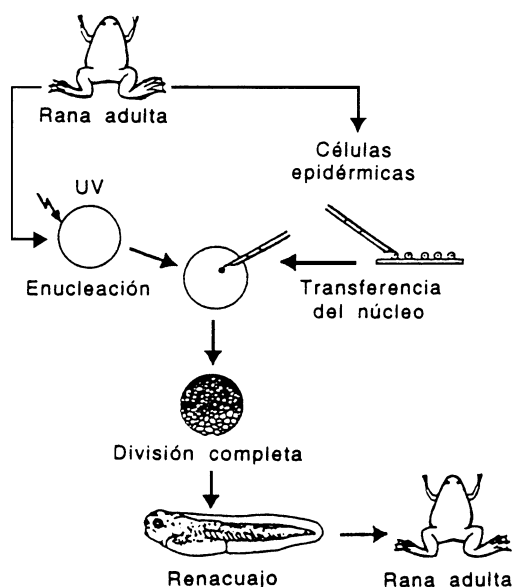


FIG. 18-1. Trasplante nuclear en la rana *Xenopus laevis*. Se cultivaron células de la piel de rana y se trasplantaron sus núcleos a huevos cuyos núcleos fueron previamente destruidos mediante rayos ultravioletas. Puesto que se obtuvieron ranas adultas, puede afirmarse que las células cutáneas contienen los genes que se necesitan para formar un organismo completo.

18-3. En las células diferenciadas el genoma permanece constante

La diferenciación celular no acarrea pérdida de información genética, de modo que en todas las células del organismo —cualquiera que sea su estado de diferenciación— existen conjuntos de genes idénticos, que por otra parte son los mismos que se hallaban en la célula huevo. Una prueba rigurosa de ello provino de experimentos de *trasplante nuclear*, en los que se irradiaron con luz ultravioleta huevos de la rana *Xenopus* con el objeto de destruir sus núcleos, y luego se les inyectaron núcleos somáticos provenientes de células epidérmicas —completamente diferenciadas— de los mismos animales. Como se observa en la figura 18-1, los huevos con núcleos somáticos fueron capaces de mantener el desarrollo normal de las ranas hasta la edad adulta, las cuales incluso resultaron fértiles. Esto demuestra que las células epidérmicas conservan todos los genes presentes en la célula huevo, incluidos los que dan lugar a la formación de las células germinativas.

El trasplante nuclear es posible también en el ratón. Como se ve en la figura 18-2, el procedimiento se basa en la inyección de un núcleo somático en un huevo recientemente fertilizado y la extracción con la misma pipeta de los pronúcleos femenino y masculino. Mediante esta manipulación, en la que es posible extraer hasta el 10% del citoplasma del huevo sin afectar su desarrollo, puede estudiarse en los mamíferos el potencial de diferenciación de las células en distintos períodos de la embriogénesis.

18-4. El estudio de las interacciones nucleocitoplasmáticas ha aportado conocimientos sobre los mecanismos que establecen y mantienen las diferenciaciones celulares

El núcleo y el citoplasma son interdependientes: uno no sobrevive sin la presencia del otro. Por ejemplo, mientras el citoplasma posee las moléculas de ARN para la síntesis de proteínas y provee la mayor parte de la energía de la célula mediante la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, el núcleo aporta la información genética que da lugar a dichos ARN.

La interdependencia entre el núcleo y el citoplasma se ha demostrado mediante experimentos de *fusión celular*. La fusión de células con ayuda del virus *Sendai* permite colocar a núcleos en ambientes citoplasmáticos ajenos a ellos. El producto de la fusión de dos células diferentes se denomina *heterocarión*, es decir, una célula con dos núcleos de distinto origen. Como se ve en la figura 18-3, ambos núcleos pueden entrar en mitosis sincrónicamente, formar una placa metafásica única, dividirse y producir células hijas híbridas. Cada célula de esta línea híbrida contiene los cromosomas de ambos núcleos.

En 1965 se observó que los núcleos de eritrocitos de pollo (normalmente inactivos), al ser fusionados con células *HeLa* —una línea celular indiferenciada derivada del carcinoma uterino de una paciente llamada Henrietta Lacks— se reactivaban. Es oportuno aclarar que los eritrocitos de mamíferos pierden el núcleo al culminar su maduración, mientras que los de las aves, anfibios y reptiles lo

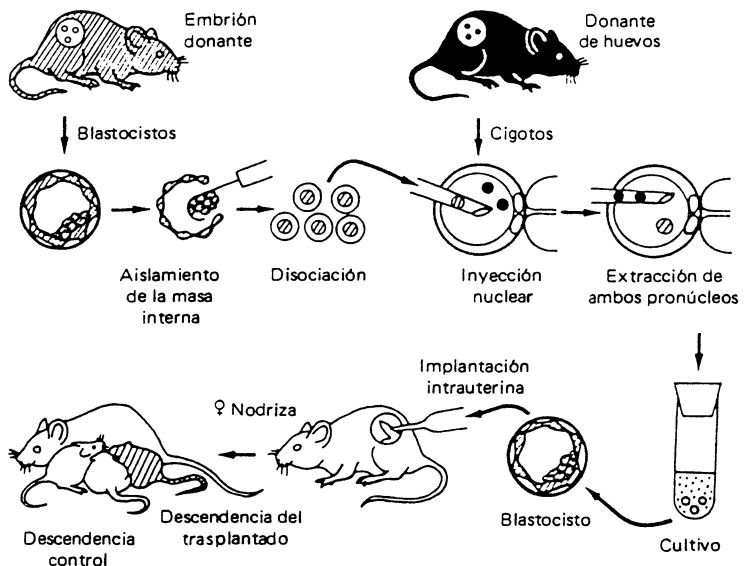


FIG. 18-2. Esquema experimental de trasplante nuclear en el ratón. Se toman blastocistos y con una micropipeta se extrae el núcleo de una de sus células. Ese núcleo se introduce con la misma micropipeta en un huevo recién fecundado, al que posteriormente se le extraen los pronúcleos masculino y femenino. El embrión así obtenido se desarrolla *in vitro* hasta el período de blastocisto y se implanta en el útero de una hembra pseudopregnada, donde evoluciona hasta el nacimiento. (Cortesía de K. Illmensee.)

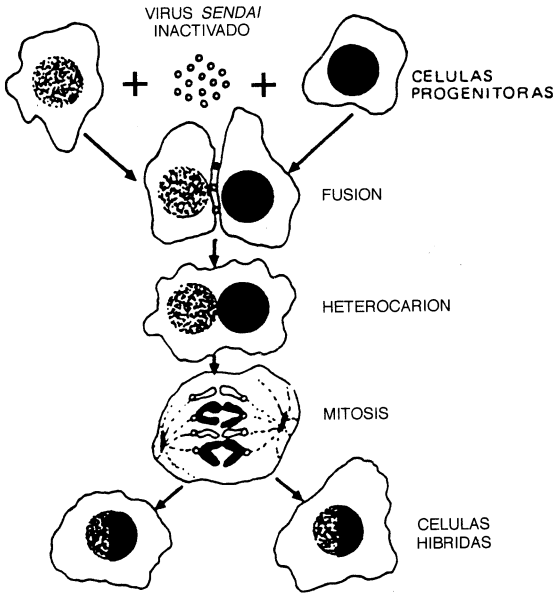


FIG. 18-3. Fusión celular mediante el virus *Sendai*, que lleva a la producción de un heterocarion con dos núcleos. La célula híbrida es el resultado de una división sincrónica de ambos núcleos, portadores de los cromosomas de las dos células progenitoras. (De N. R. Ringertz y R. E. Savage, 1976.)

retienen en forma inactiva. Así, los eritrocitos de pollo son células diferenciadas terminales de vida breve y con un núcleo muy condensado, que no sintetiza ADN ni ARN. El interés de este heterocarion reside en que, después de la fusión con células HeLa, el núcleo del eritrocito de pollo aumenta su volumen unas 20 veces, su cromatina se dispersa, comienza a sintetizar ARN, forma un nucléolo y su ADN puede replicarse. En consecuencia, tales núcleos pueden reanudar la síntesis de ARN y ADN a pesar de pertenecer a eritrocitos completamente diferenciados.

La revelación más importante derivada de los experimentos de fusión celular es que la síntesis de ARN y de ADN en el núcleo es controlada por el citoplasma. Se necesita un citoplasma ajeno para reactivar el núcleo del eritrocito de pollo, lo cual puede demostrarse mediante la fusión de eritro-

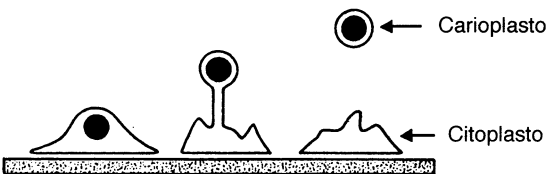


FIG. 18-4. Formación de carioplastos y citoplastos a partir de células adheridas a superficies de plástico y tratadas con citocalasina B.

citos con células HeLa enucleadas. Las células HeLa enucleadas pueden obtenerse por centrifugación después de usar *citocalasina B*, droga que inhibe a los filamentos de actina. En cada célula tratada el núcleo tiende a escaparse, pero lo logra parcialmente pues queda ligado por un pequeño tallo de citoplasma (fig. 18-4). Si estas células son centrifugadas, los núcleos acaban por desprenderse y los citoplasmas quedan adheridos al medio de sostén del cultivo. Se forman entonces núcleos con una pequeña capa de citoplasma (*carioplastos*) y citoplasmas sin núcleo (*citoplastos*). Las células enucleadas mediante el método de la citocalasina permanecen viables por lo menos dos días después de la enucleación y cumplen muchas de sus funciones normales. Por ejemplo, no se ven afectadas en ellas la motilidad celular ni la pinocitosis. Es evidente, entonces, que estas funciones citoplasmáticas no dependen del núcleo celular.

Se pueden fusionar carioplastos con citoplastos de células distintas por medio del virus *Sendai*. Las células así constituidas sintetizan ARN, a veces entran en división, y sobreviven más tiempo que los citoplasmas enucleados. Por otra parte, si se fusionan células de hepatoma de rata (que secretan albúmina) con linfocitos de ratón, se obtiene una línea celular híbrida que produce albúmina de rata y de ratón simultáneamente.

En síntesis, todos los experimentos de fusión o hibridación de células somáticas han demostrado que sustancias presentes en el citoplasma modifican la expresión de los genes en el núcleo y, en consecuencia, la producción de los correspondientes ARN.

18-5. El control de la actividad génica se cumple en varios niveles

Los experimentos de trasplante nuclear han demostrado que los genes no se pierden en el curso de la diferenciación celular y que las diferencias entre las células especializadas se deben a que en cada tipo celular se expresan conjuntos de genes distintos. Concurrentemente, los resultados obtenidos con los experimentos de fusión celular no dejan dudas de que el citoplasma contiene componentes capaces de regular la actividad de los genes. En la sección 18-7 veremos que si en la célula huevo estos componentes se distribuyeran asimétricamente en el citoplasma y, como consecuencia, se repartieran entre las células embrionarias hijas en forma despareja, podrían desempeñar un papel fundamental en el establecimiento de las primeras diferenciaciones celulares en el embrión.

Como se señaló en los capítulos 12 y 13, el control de la actividad génica se cumple en varios niveles, aunque el más generalizado es el control

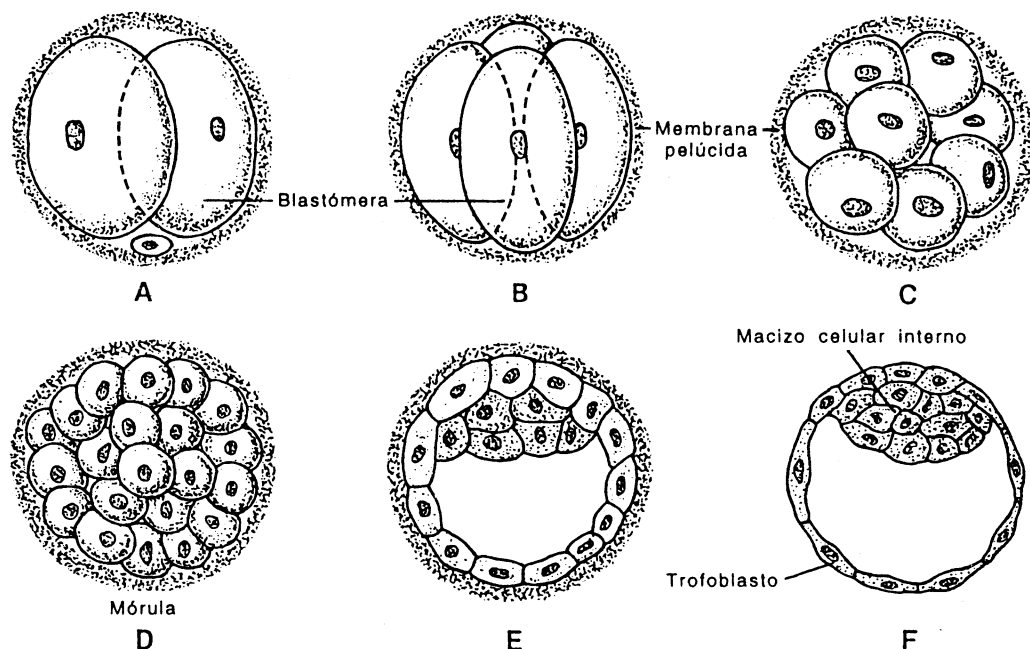


FIG. 18-5. Segmentación o clivaje de la célula huevo hasta la formación del blastocisto (F).

transcripcional. Así, debe recordarse el modo como actúan los factores de transcripción, la importancia del grado de enrollamiento de la cromatina, y los efectos regulatorios de la metilación de las citosinas sobre el ADN. Vinculando estos aspectos con el reparto asimétrico de los componentes citoplasmáticos de la célula huevo entre las primeras células embrionarias, diversas experiencias sugieren que algunos de esos componentes podrían ser *factores de transcripción específicos* que activan, en las sucesivas células hijas, a determinados *genes rectores* conforme la célula huevo se segmenta. En las etapas posteriores del desarrollo embrionario, además del mecanismo regulatorio antedicho, la diferenciación celular deriva de fenómenos postranscripcionales; éstos se producen, por ejemplo, a nivel del procesamiento de los ARN, del pasaje controlado de ellos al citoplasma, de la regulación de la síntesis proteica en los ribosomas y del procesamiento diferencial de proteínas ya sintetizadas.

18-6. La aparición de las diferenciaciones celulares en el embrión y el modo como se desarrolla el plan corporal constituyen algunos de los principales enigmas de la biología actual

La cuestión de cómo aparecen las diferencias entre las células en el curso de la embriogénesis constituye uno de los grandes enigmas de la biología del desarrollo. Si bien en los últimos años se han adquirido importantes conocimientos al res-

pecto, los interrogantes esenciales continúan sin respuesta, aunque han ido cediendo inexorablemente conforme progresa su investigación.

Otra cuestión que desvela a los investigadores es el modo como se establece la organización espacial del cuerpo. Como se sabe, las células, a medida que se reproducen y diferencian, no quedan mezcladas para ordenarse más tarde, sino que paso a paso construyen el cuerpo en pequeña escala. Ello se debe a que simultáneamente las células van armando una suerte de andamiaje, sobre el cual se establece el modelo o *plan corporal* que determina la estructura definitiva del cuerpo.

18-7. Los determinantes citoplasmáticos se reparten asimétricamente en la célula huevo

Los organismos multicelulares se desarrollan a partir de una célula huevo que, tras sucesivas divisiones y diferenciaciones, da origen a la totalidad de las células que componen los tejidos corporales. En primer término el cigoto experimenta una serie de divisiones rápidas, en cada una de las cuales se duplica sólo el ADN. Como el citoplasma de las sucesivas células hijas se va reduciendo o segmentando con cada ciclo divisional, a estas divisiones se las denomina de *segmentación* o *clivaje* (fig. 18-5). Cabe señalar que a partir del estadio de 16 células los citoplasmas de éstas se hallan comunicados por *uniones en hendidura*, y las células periféricas quedan ligadas entre sí por *uniones estrechas*.

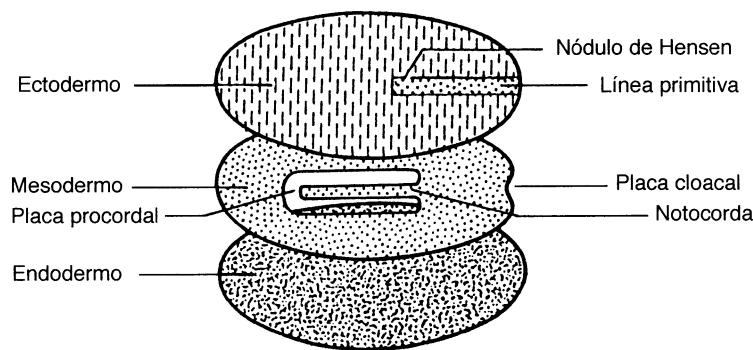


FIG. 18-6. Embrión trilaminar de 21 días.

Cuando el embrión alcanza las 16 células adquiere la forma de una esfera sólida con aspecto de mora, por lo cual recibe el nombre de *mórula*. Pronto el embrión se convierte en una esfera hueca, llamada *blastocisto*, en la que se visualizan dos tipos de tejidos: el *macizo celular interno*, primordio del futuro cuerpo del individuo, y el *trofo-*blasto**, que interviene en la formación de la placenta (fig. 18-5). Posteriormente, el macizo celular interno da lugar a un embrión discoide plano con tres capas epiteliales superpuestas —el *ectodermo*, el *mesodermo* y el *endodermo*—, entre las cuales existen inequívocos signos de diferenciación (fig. 18-6).

Nos ocuparemos ahora de la forma como surgen las diferencias iniciales entre las células del embrión primitivo. Dado que las células diferenciadas más primitivas no escapan a la regla de poseer todas los mismos genes, las desigualdades iniciales entre ellas deben buscarse en el citoplasma que heredan de la célula huevo. En efecto, se considera que el citoplasma de la célula huevo contiene —asimétricamente distribuidas— moléculas que llevan el nombre de *determinantes citoplasmáticos* del desarrollo, los cuales se reparten de manera desigual entre las células del embrión (fig. 18-7). Más aún, se cree que estos determinantes son proteínas que actúan como factores de transcripción específicos (sección 18-5).

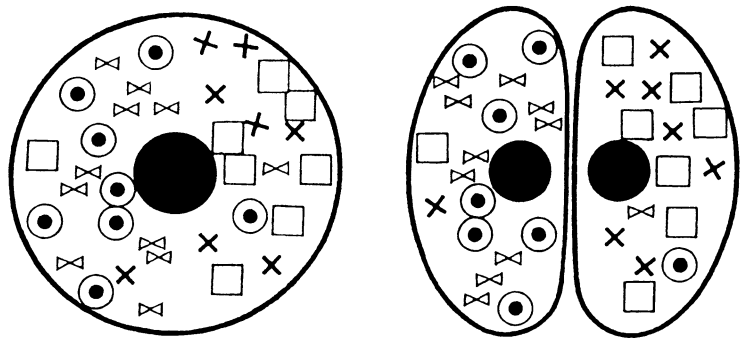


FIG. 18-7. Determinantes citoplasmáticos del desarrollo en la célula huevo. Obsérvese cómo se reparten asimétricamente entre las células hijas.

18-8. La idea de la distribución asimétrica de los determinantes citoplasmáticos fue presentada hace más de 100 años

La idea de que el citoplasma de la célula huevo contiene determinantes que se distribuyen en forma desigual entre las células hijas y afectan la actividad nuclear no es nueva. En la edición de 1896 de la clásica obra de E. B. Wilson, *The Cell in Development and Heredity*, el desarrollo embrionario primitivo aparece resumido de la siguiente manera:

“Si la cromatina fuese el idioplasma (término antiguo aplicado a los genes) en el cual se reuniera la suma total de las fuerzas de la herencia, y se distribuyera por igual con cada división celular, ¿de qué manera podría variar su modo de acción en las distintas células para causar diferencias de estructuras (es decir, diferenciación)? Por la influencia del idioplasma (genes), el citoplasma del huevo, o de los blastómeros derivados de éste, experimenta cambios específicos y progresivos, y cada cambio reacciona sobre el núcleo e incita un nuevo cambio. Estos cambios difieren en las distintas regiones del huevo debido a diferencias preexistentes, químicas y físicas, en la estructura citoplasmática, y éstas constituyen las condiciones bajo cuya influencia actúa el núcleo.”

Como vemos, algunos de nuestros conceptos sobre el desarrollo han cambiado poco en el curso de los años. Por otro lado, a lo largo del camino hemos aprendido bastante acerca de la manera como son controlados los genes. Los métodos de estudio de que disponemos han hecho del control de la actividad génica uno de los campos de la ciencia biológica que avanza con mayor celeridad. Así, la sensación de optimismo de quienes creen que se llegará muy pronto a comprender detalladamente cómo son controlados los genes durante el desarrollo embrionario parece justificada.

18-9. La segregación de los determinantes citoplasmáticos es fácilmente detectable en algunas especies

En algunas especies la segregación de los determinantes citoplasmáticos de la célula huevo es evidente. Un buen ejemplo lo proporcionan los huevos de anfibios (y otras especies), ya que contienen en sus citoplasmas una región llamada *plasma germinativo*, que puede reconocerse porque poseen unos gránulos especiales. Esta región del citoplasma es la que da origen, al culminar la segmentación del huevo, a las células germinativas del nuevo organismo. Así, cuando se irradia con luz ultravioleta el plasma germinativo de esos huevos, se obtienen animales estériles. Por otra parte, si se inyectan plasmas germinativos en otros puntos del huevo, aparecen en el individuo adulto células germinativas en localizaciones anormales.

18-10. Los ovocitos acumulan sustancias para ser usadas durante el desarrollo incipiente del nuevo individuo

En general, los ovocitos —y, por lo tanto, las células huevo— son muy grandes, ya que acumulan muchas de las moléculas necesarias para que se concreten las primeras etapas del desarrollo embrionario. Por ejemplo, un ovocito de *Xenopus* contiene 100.000 veces más de ARN polimerasa, histonas, mitocondrias y ribosomas que una célula somática del mismo animal adulto. Una de las razones para acumular estos materiales —en lugar de sintetizarlos *de novo* durante la embriogénesis temprana— es la extraordinaria rapidez de las divisiones celulares durante la segmentación o clivaje de la célula huevo. Tal velocidad no da tiempo para la síntesis de nuevos ARN y proteínas. Se sabe que la mayoría de estas moléculas se forman durante la ovogénesis, de modo que están presentes en el citoplasma del ovocito mucho antes de que se produzca la fecundación. Obviamente, esas moléculas son codificadas por genes pertenecientes a la madre, no al embrión.

La primera división de segmentación en el huevo de *Xenopus* tiene lugar 90 minutos después de la fertilización. Las once divisiones siguientes se producen, en forma sincrónica, cada 35 minutos. Compárese este tiempo con el de 24 horas utilizado por una célula común para dividirse. La producción de estos ciclos celulares tan cortos se debe a que en el ADN de las primeras células embrionarias aparecen muchos más orígenes de replicación (lo que acorta la fase S) y las células omiten las fases G1 y G2. Así, cada mitosis es seguida por otra en forma inmediata. La síntesis de ARN comienza sólo a partir de la duodécima división de segmentación. La causa que impide esa síntesis en las etapas previas sería la presencia de una sustancia que se une a la cromatina y anula la transcripción del ADN. Dado que su cantidad sería suficiente para bloquear el ADN de hasta 4.000 núcleos, esa sustancia se agota en la duodécima división de segmentación y entonces los genes pueden comenzar a expresarse.

En muchas especies la localización de las moléculas aportadas por el ovocito no se halla fijada de antemano. Por ejemplo, en el huevo de *Xenopus* la corteza se contrae en dirección del punto de entrada del espermatozoide y esto produce en el lado opuesto un área denominada *medialuna gris*. Más tarde esta región da origen al *blastoporo*, es decir, al lugar donde las células superficiales se invaginan para formar el mesodermo. En consecuencia, el punto de entrada del espermatozoide, que es fortuito, determina la posición del eje dorsoventral del futuro individuo (fig. 18-8).

18-11. En los embriones de mamíferos las primeras ocho células son totipotentes

La dispar distribución de las moléculas contenidas en la célula huevo se extiende —diversificándose cada vez más— a las sucesivas generaciones de células, lo cual se prolongaría hasta la formación del embrión trilaminar.

No obstante, en los mamíferos lo antedicho no es aplicable hasta la cuarta división de segmentación, ya que al cabo de las tres primeras, al formarse el embrión de 8 células, entre éstas y el cigoto aparentemente no existe diferenciación. Así, hasta ese estadio cada una de las células es *totipotente*, es decir, puede generar un organismo completo, como la propia célula huevo (esta condición es la que hace posible el desarrollo de gemelos idénticos). En síntesis, es probable que en los citoplasmas de las primeras 8 células embrionarias existan moléculas cuantitativa y cualitativamente equivalentes a las de la célula huevo y que, por lo tanto, su distribución hasta allí haya sido pareja.

18-12. En las etapas más primitivas del desarrollo embrionario las células podrían diferenciarse de acuerdo con sus posiciones

En los embriones de mamíferos no se descarta el siguiente mecanismo para la generación de las primeras diferenciaciones celulares. Durante el traslado del embrión por la trompa de Falopio, sus células, de acuerdo con las posiciones que ocupan en la mórula, serían alcanzadas por diferentes concentraciones de sustancias presentes en el medio. Así, cuanto más profunda es la ubicación de una célula en la mórula, menos concentradas le llegarían tales sustancias, y esa disimilitud podría contribuir al desencadenamiento de las primeras diferenciaciones celulares. Cabe señalar que las sustancias que ingresan al embrión se propagan de una célula a otra a través de las uniones en hendidura aparecidas apenas se constituye la mórula, cuando se alcanza el estadio de 16 células (sección 18-7).

Toda sustancia difusible que produce respuestas distintas en una célula dada de acuerdo con su grado de concentración lleva el nombre de *morfógeno*. La calidad de la respuesta (en este caso, el tipo de diferenciación) se debería a que en la célula se activarían genes distintos según que el nivel del morfógeno que llega a ella se halle por debajo o por encima de determinados *umbrales* de concentración.

18-13. Los valores posicionales de las células embrionarias crean las bases para la aparición de los fenómenos inductivos

Las sustancias involucradas en la generación de las primeras diferenciaciones tienen una responsabilidad adicional: dejar establecidos los cimientos

que condicionan la aparición de las diferenciaciones futuras. En efecto, a medida que los grupos celulares se ubican en sus correspondientes emplazamientos corporales, esas sustancias les confieren a las células determinados *valores posicionales*, distintos entre sí. Estos valores comienzan a tener vigencia a partir del momento en que las células embrionarias se distribuyen en tres capas epiteliales superpuestas (formando el embrión plano trilaminar), lo que da lugar a relaciones de vecindad entre las células que hacen posible la influencia de algunos grupos celulares sobre otros (fig. 18-6). Así, en este nuevo contexto, un grupo celular puede actuar sobre otro —el primero emitiendo una señal y el segundo diferenciándose— al posibilitar sus respectivos valores posicionales tal acción y tal reacción. En otras palabras, los valores posicionales crean las bases para la aparición de los *fenómenos inductivos*, propulsores de la mayor parte de las diferenciaciones venideras. Los estudiaremos después de analizar cómo se establece el modelo corporal en los embriones de los mamíferos.

18-14. El plan corporal se establece muy tempranamente en los embriones

En los embriones de los mamíferos, las polaridades corporales —o sea, los ejes cefalocaudal, dorso-ventral y mediolateral del cuerpo— se establecen apenas comienza a formarse el mesodermo, la tercera en aparecer de las tres capas epiteliales que integran el disco embrionario. El punto de referencia para tales coordenadas es el *nódulo de Hensen*, lugar de origen de la *notocorda* y de las partes restantes del citado mesodermo; esas partes son: la placa cardiogénica, el mesodermo branquial, los

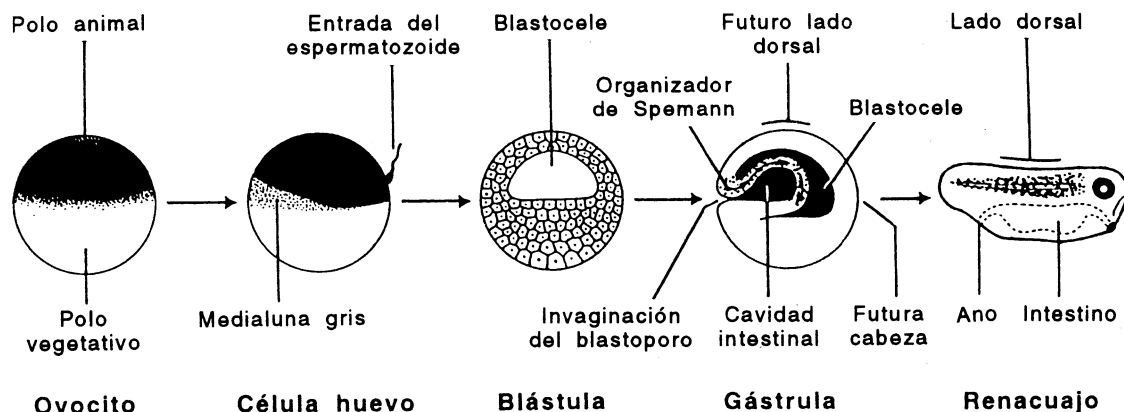


FIG. 18-8. Desarrollo de la rana *Xenopus laevis*. La gastrulación comienza a las 10 horas de la fecundación y durante su transcurso se producen extensos movimientos celulares con fines morfogenéticos. El blastoporo se forma en el centro de una zona pigmentada llamada medialuna gris, que aparece en el lado opuesto al de la entrada del espermatozoide. Este punto determina el eje dorsal del embrión. (Cortesía de J. B. Gurdon.)

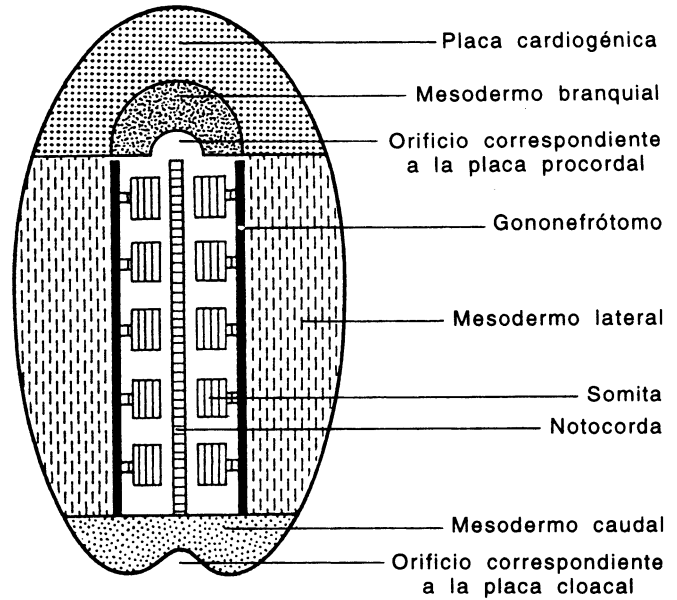


FIG. 18-9. Distintos sectores en que se segmenta la hoja mesodérmica del embrión de 21 días, los cuales le confieren una evidente polaridad corporal.

somitas, los gononefrótomos y los mesodermos laterales (fig. 18-9).

El embrión plano trilaminar no tarda en ingresar en una etapa saliente de su desarrollo y a la vez crucial para el establecimiento del modelo a partir del cual se formará el cuerpo del futuro individuo. En ella el disco embrionario se pliega tanto longitudinal como transversalmente, lo que da lugar a un cuerpo cilíndrico, con sus extremos cefálico y caudal, sus caras ventral y dorsal y sus lados derecho e izquierdo perfectamente identificables.

Más aún, en el dorso —previa aparición de un surco ectodérmico— se forma el *tubo neural*, y es posible distinguir a lo largo de su eje cefalocaudal una sutil *metamerización* (o segmentación), particularmente en el prosencéfalo y en el rombencéfalo. Los segmentos en que se divide el prosencéfalo se denominan *prosómeras*, y los del rombencéfalo, *rombómeras*.

Una vez formado el tubo neural, a los lados de la futura médula espinal quedan localizados los *somitas*, cuyo conjunto de bloques —sucesivamente dispuestos— también se considera una segmentación metamérica del cuerpo (fig. 18-9).

Simultáneamente con el establecimiento del plan general del cuerpo comienzan a aparecer los esbozos y a diferenciarse las células de prácticamente todos los órganos del cuerpo. El primer sistema orgánico en aparecer —y funcionar— es el cardiocirculatorio, cuya sangre —en una etapa posterior— habrá de transportar importantes sustancias promotoras de diferenciaciones (hormonas) (sección 18-18).

18-15. Las diferenciaciones generadas por fenómenos inductivos comienzan a aparecer cuando se forma el embrión trilaminar

Las *inducciones* son procesos por los cuales las células de algunos tejidos incitan a las células de otros tejidos a que se diferencien, es decir, a que se transformen en otros tipos celulares (según la oportunidad, también pueden hacer que mueran, cambien su ritmo de proliferación o se movilicen). La manifestación de este mecanismo biológico revela la existencia de por lo menos tres grupos celulares distintos: unos que se comportan como inductores, otros que son inducidos y otros que no inducen ni se dejan inducir.

Para que las células puedan ser inducidas tienen que ser *competentes*, es decir, deben tener la capacidad de reaccionar con un cambio (diferenciación) ante la presencia de un estímulo inductor. Tal competencia abarca un período muy preciso, de modo que si el inductor actúa antes o después del momento adecuado, su influencia es nula; no obstante, en algunos casos una misma célula puede seguir distintas vías de diferenciación de acuerdo con el momento en que la influye el inductor. Por otro lado, a veces tejidos inductores también tienen un tiempo limitado para ejercer sus acciones inductivas.

Un ejemplo de inducción y competencia lo ofrecen la notocorda y el ectodermo situado encima de ella (fig. 18-6): la notocorda carece de acción inductiva sobre el endodermo y el resto del mesodermo debido a que estos tejidos no son competentes como lo es el ectodermo. Parte de éste se

diferencia en tejido nervioso al ser inducido precisamente por la notocorda, único tejido habilitado para tal fin. Vemos entonces que la notocorda y el ectodermo son diferentes entre sí y respecto de los otros tejidos no sólo por sus localizaciones y características morfológicas, sino también por sus comportamientos inductivos. Estos estados derivan de las historias previas de los distintos grupos celulares, las cuales a su vez dependen de los valores posicionales generados por los determinantes citoplasmáticos de la célula huevo, asimétricamente heredados.

18-16. Se han identificado algunas moléculas capaces de generar inducciones tempranas en el embrión

El tipo de inducción que acabamos de analizar exige que los tejidos que participan sean vecinos, pues el tejido inductor ejerce su influencia por medio de moléculas difusibles que secreta al medio y que alcanzan al tejido competente si éste se encuentra cerca (*secreción paracrina*). Cabe agregar que el tejido reacciona —es competente— si sus células poseen *receptores específicos* para tales moléculas.

Ultimamente se han identificado algunas moléculas con probada capacidad para generar inducciones. Una de ellas, a la que se le ha dado el nombre de *activina*, fue detectada en el embrión temprano de *Xenopus*, en el que podría desempeñar un papel en la inducción que emana del labio dorsal del *blastoporo* (es decir, el *organizador de Spemann*), una estructura en cierto modo equivalente al nódulo de Hensen de los embriones trilaminares de los vertebrados superiores (figs. 18-6 y 18-8). La activina pertenece a la superfamilia de los *factores de crecimiento TGF-β*, lo mismo que otra molécula con similares funciones inductivas, llamada *Vgl*.

El *factor de crecimiento fibroblástico* (FGF) también está involucrado en actividades inductivas durante el desarrollo embrionario.

En diversas localizaciones de embriones de varias especies se han descubierto otras moléculas con funciones inductivas, como la *dorsalina* —perteneciente a la superfamilia de los *TGF-β*—, una familia de moléculas llamadas *Wnt* —necesarias para la formación del mesodermo y el desarrollo del sistema nervioso central—, las proteínas denominadas *noggin* y *slug* —involucradas en la inducción del tejido neural—, el *ácido retinoico* —inductor de varias estructuras embrionarias— y las proteínas *Shh* (por *sonic hedgehog*) y *BMP* (por *bone morphogenetic*), promotoras del desarrollo de los miembros.

18-17. Algunos inductores se comportan como morfógenos

En algunos casos las sustancias inductoras se comportan como morfógenos, ya que, después de ser secretadas por el tejido inductor, sus concentraciones decrecen a medida que fluyen por los citoplasmas de las células. Según sus posiciones en el tejido inducido, las células reciben distintas concentraciones del morfógeno, motivo por el cual se convierten en tipos celulares diferentes entre sí. Más aún, cada umbral de concentración del morfógeno le provee a cada célula un valor posicional singular, que se conserva en forma indeleble, independientemente de que las células se mantengan juntas en el tejido o se separen y ubiquen en puntos distantes en el embrión. Los distintos valores posicionales crean las bases para las conductas futuras de las células, incluida la posibilidad de que experimenten ulteriores diferenciaciones.

18-18. En etapas más avanzadas del desarrollo se producen inducciones entre tejidos distantes

En etapas más avanzadas del desarrollo embrionario aparece una clase de inducción mediada por *hormonas* —es decir, entre tejidos distantes— que se agrega a la anterior. Una vez elaboradas por las células inductoras, las hormonas llegan a sus lugares de destino transportadas por la sangre (*secreción endocrina*). Como en las inducciones mediadas por secreciones paracrinas, las células competentes son las que poseen *receptores específicos* para las respectivas clases de hormonas.

Cabe advertir que los procesos inductivos —por vecindad o a distancia— continúan durante toda la vida prenatal y no cesan después del nacimiento, ya que son imprescindibles para el funcionamiento correcto del organismo y su supervivencia. El modo como actúan las moléculas inductoras sobre los receptores celulares y la forma de propagación de esas señales en el interior de las células hasta generar la respuesta adecuada son temas analizados en el capítulo 7.

18-19. La determinación de cambiar se fija en las células antes que revelen estar diferenciadas

Las células adquieren el “compromiso” de cambiar antes que revelen estar diferenciadas. Este compromiso previo, llamado *determinación*, es irreversible y puede ser fijado, de acuerdo con el momento del desarrollo, por un determinante citoplasmático o por una sustancia inductora. Existe, entonces, un período de latencia —que varía con

cada tipo celular— entre el instante en que la célula queda determinada y el momento en que se hace evidente su diferenciación.

18-20. *Cuanto menos diferenciada se halla una célula, mayor es su potencialidad evolutiva*

Lleva el nombre de *potencialidad evolutiva* la condición biológica que le permite a una célula generar un número determinado de células diferentes; así, cuanto más grande es el número de tipos celulares que una célula es capaz de originar, mayor es su potencialidad (fig. 18-10). La célula huevo, por ser la predecesora de todos los tipos celulares del organismo, es la que posee la potencialidad evolutiva más alta. Conforme avanza el desarrollo y aparecen los sucesivos tejidos embrionarios, la potencialidad de las células declina. Los somitas, por ejemplo, dan origen a un número más restringido de tipos celulares.

Cuando una célula alcanza su máximo grado de diferenciación —o sea, cuando adquiere las características de uno de los tipos celulares presentes en el organismo adulto—, su potencialidad desaparece. Se dice, entonces, que ha alcanzado su *significado evolutivo* final. Las células embrionarias aumentan su significado evolutivo (se acercan al tipo celular que han de alcanzar al final de su evolución) al mismo tiempo que restringen sus potencialidades evolutivas (conforme se diferencian, pueden originar un menor número de clases de células).

En algunos tipos celulares la potencialidad se mantiene relativamente elevada en forma permanente, aun en la vida posnatal. Por ejemplo, en la médula ósea existe una célula multipotencial que da origen a los eritrocitos, los granulocitos, los linfocitos, los monocitos y las plaquetas.

Por otro lado, en situaciones vinculadas con la reparación de tejidos, células que ya han alcanzado su significado evolutivo final suelen desdiferenciarse y retroceder a un estado más primitivo, imprescindible para su multiplicación. Veamos el siguiente ejemplo: si se extirpa una parte del hígado, algunas células del sector no extirpado se desdiferencian y multiplican; recuperado el tamaño del órgano, vuelven a diferenciarse y recobran las características de las células hepáticas originales.

No existen constancias de que una célula pueda desdiferenciarse hasta reasumir un grado de potencialidad evolutiva tal que le permita volver a diferenciarse en otro sentido, esto es, en un tipo celular distinto al que pertenecía. Es que, una vez que las células fueron determinadas, sus estados diferenciales quedan establecidos a perpetuidad. Veremos en seguida que si la célula se divide, la estabilidad de su diferenciación se transmite a las células hijas, hecho que se repite de generación en generación.

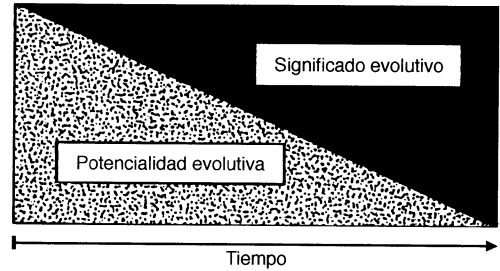


FIG. 18-10. Diagrama que representa la caída de la potencialidad evolutiva y el aumento inversamente proporcional del significado evolutivo en un tejido embrionario.

18-21. *Los estados de diferenciación se mantienen estables y se transmiten a las células hijas*

Una de las características de la diferenciación celular en los organismos superiores es que, una vez establecida, se mantiene estable y persiste hasta la muerte de la célula. Por ejemplo, las células que no se dividen (neuronas, etc.) permanecen como tales durante toda la vida del individuo. Algo similar ocurre con las células que se dividen asiduamente (epidérmicas, etc.); si bien mueren al poco tiempo, lo hacen sin cambiar su estado de diferenciación.

Las células diferenciadas no pueden convertirse en otros tipos celulares bajo ninguna condición, ni siquiera cuando son sometidas a las más complejas manipulaciones experimentales (por lo menos con los recursos actuales). Esta condición biológica se conoce con el nombre de *memoria celular*, y depende de la persistencia en la célula de las causas que controlan la expresión de los genes, es decir, los factores de transcripción, la metilación del ADN y el grado de enrollamiento de la cromatina (cap. 12-7 a 12-13). Estos mecanismos se mantienen a lo largo de toda la vida de las células mediante procesos biológicos no muy bien comprendidos, aunque seguramente relacionados con ciertas sustancias presentes en los citoplasmas, específicas de cada tipo celular. Esta presunción es respaldada por los experimentos de trasplante nuclear descritos en la sección 18-3, ya que en la célula trasplantada no se expresan los genes que se hallaban activos cuando el núcleo estaba en su citoplasma original, y se expresan los que lo hacían en el núcleo de la célula enucleada (fig. 18-1).

Los estados de diferenciación pasan a las células hijas de generación en generación hasta la última de las células descendientes. Esta *herencia de la memoria celular* se debe a que cuando el ADN se replica (fase S), los elementos que controlan la expresión de los genes, más que mantenerse, se du-

plican, de modo que en las células hijas aparecen los mismos factores de transcripción, los mismos patrones de metilación del ADN y los mismos modelos de condensación de la cromatina que en las células progenitoras.

18-22. El establecimiento del plan corporal es el resultado de decisiones escalonadas tomadas por una serie de genes

Al iniciarse el desarrollo embrionario, el genoma, además de codificar la síntesis de las proteínas que dan lugar a los distintos tipos celulares, aporta el programa que lleva al establecimiento del *modelo tridimensional del cuerpo*. Las informaciones contenidas en ese programa y sus consecuencias —que aparecen apenas el espermatozoide fecunda al óvulo y continúan hasta etapas relativamente avanzadas del desarrollo embrionario— han comenzado a develarse, ya que se ha descubierto la forma como las claves unidimensionales contenidas en los genes dan lugar a organismos tridimensionales. Los datos más reveladores provienen de trabajos realizados en la mosca *Drosophila melanogaster*, cuyo desarrollo embrionario pasamos a reseñar (muy sucintamente) con el propósito de facilitar la comprensión del tema que nos ocupa (fig. 18-11).

La *Drosophila* se desarrolla —luego de formarse la célula huevo tras la fecundación y atravesar el período embrionario— a partir de una *larva*. Esta se halla compuesta por una sucesión de *segmentos* —uno cefálico, tres torácicos y ocho abdominales—, los cuales le confieren una clara *polaridad espacial*, pues tan pronto aparecen quedan configurados los ejes cefalocaudal, dorsoventral y medio-

lateral del cuerpo larvario. La larva se convierte en mosca —estado adulto llamado también *imago*— a partir de varios grupos celulares que aparecen y se asientan debajo de la epidermis de los segmentos larvarios. Estos grupos celulares se conocen con el nombre de *discos imaginales*; existen nueve pares a los lados de la línea media de la larva, más uno impar situado en el extremo caudal (19 discos en total). Cada disco da origen a una de las estructuras exteriores de la mosca. Así, de un par de discos surgen los ojos y las antenas, de otro las alas y parte del tórax, de otros las patas unidas al resto del tórax, de otros las estructuras integradas en el abdomen, etc. Estas partes, adecuadamente ensambladas, forman un cuerpo adulto también segmentado, como lo era el de la larva.

Si bien desde el principio las células de todos los discos imaginales son morfológicamente idénticas, ya están determinadas, pues generan —cualquiera que sea la manipulación experimental a que se las someta— sólo las estructuras pertenecientes a sus segmentos de origen. En efecto, si se trasplanta un par de discos imaginales a la posición de otro par, al formarse la mosca adulta los discos injertados desarrollan las estructuras correspondientes a sus emplazamientos originales, independientemente de su nueva localización.

El desarrollo del plan corporal que acabamos de describir se halla controlado por una compleja red de genes reguladores, que comienzan a ejercer sus funciones apenas se forma la célula huevo. Los primeros en actuar son los llamados *genes de la polaridad de la célula huevo*, que pertenecen a la madre; tienen por misión establecer los ejes cefalocaudal, dorsoventral y mediolateral del cuerpo.

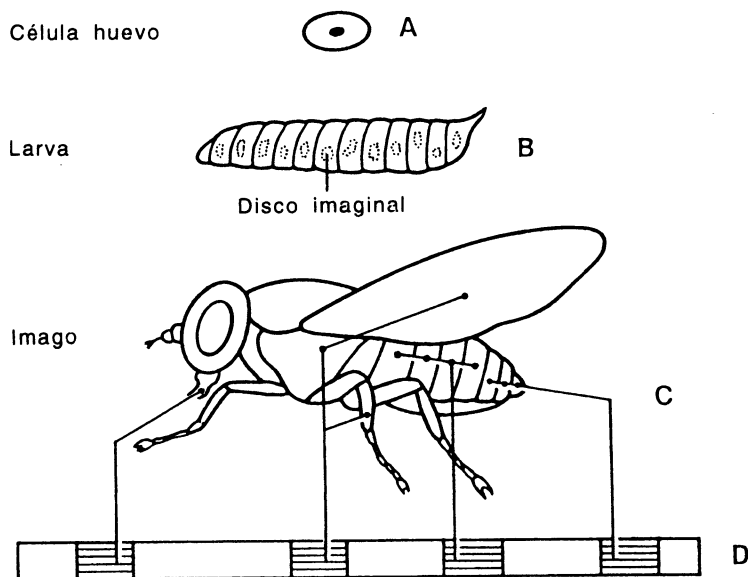


FIG. 18-11. Desarrollo de la mosca *Drosophila melanogaster*. En la parte inferior aparece uno de los cromosomas de la mosca en el que se localizan varios genes con caja homeótica. Obsérvese su ordenamiento, en correspondencia con el orden de los segmentos corporales en que se expresan.

Luego lo hacen tres conjuntos de genes agrupados bajo el nombre de *genes segmentarios*; son los que dan lugar a la formación de los segmentos larvarios. Finalmente actúan los denominados *genes homeóticos*, de los cuales deriva la formación de los discos imaginales y, consecuentemente, el desarrollo de las estructuras exteriores de la mosca adulta (ojos, antenas, alas, patas, tórax, abdomen, etc.).

La polaridad del cuerpo se instala desde el comienzo del desarrollo embrionario por la presencia de ciertas moléculas —heredadas del ovocito— que, como en éste antes de la fecundación, se concentran y distribuyen en forma desigual en los distintos sectores de la célula huevo. Tras las divisiones de segmentación esas moléculas son heredadas —también en forma desigual— por las primeras células embrionarias, lo cual fija las polaridades espaciales del futuro cuerpo larvario. Es obvio que tales moléculas, al provenir del ovocito, no son codificadas por genes del embrión sino por los ya mencionados genes de la polaridad de la célula huevo, pertenecientes al ovocito, es decir, a la madre. En realidad, algunos de estos genes corresponden a las células foliculares que rodean al ovocito, ya que tales células, durante la permanencia de la célula germinativa en el ovario, sintetizan las moléculas a que hacemos referencia (ARNm y proteínas) y las vuelcan en su citoplasma.

Dijimos que existen tres clases de genes segmentarios; son los llamados *genes de hendidura*, los de *regla par* y los de *la polaridad de los segmentos*. Se expresan, en ese orden, al ser activados por las señales posicionales emanadas de las moléculas presentes en las células embrionarias, establecidas con anterioridad. De estos genes depende la formación de los segmentos larvarios y, en ellos, el desarrollo de detalles cada vez más finos.

Finalmente se expresan los genes homeóticos, al ser activados por los productos de varios genes que actuaron precedentemente. Definen la formación de las partes adultas de la *Drosophila*. Así, según los discos imaginales en que se expresan, algunos forman la cabeza, otros los segmentos torácicos y otros los segmentos abdominales. Estos genes están alineados en el cromosoma siguiendo el mismo orden espacial en que se hallan los segmentos corporales en la mosca, comenzando por los que dan lugar a estructuras pertenecientes a la cabeza y terminando con los que se expresan en la cola (fig. 18-11).

Surge de lo expuesto que los tres tipos de genes que participan en la construcción del plan corporal lo hacen mediante una sucesión de activaciones en forma de cascada, de modo que cada gen (por intermedio de la proteína que codifica) tiene por misión no sólo producir la diferenciación correspondiente, sino también activar al gen que actuará

después, tanto en el tiempo (vimos el orden en que se expresan) como en el espacio (siempre lo hacen en dirección cefalocaudal). Además, el producto de cada gen influye sobre los genes que actuaron precedentemente, lo cual imprime en las células de cada segmento —en forma indeleble— un determinado *valor posicional*. El conjunto de estos valores, además de consolidar la organización del plan corporal, crea las bases para la aparición de las próximas diferenciaciones, ahora sustentadas por fenómenos inductivos, es decir, por la acción de algunos grupos celulares sobre otros.

18-23. Los genes que participan en la formación del plan corporal contienen una secuencia de nucleótidos conservada, llamada caja homeótica

Los genes que participan en la formación del plan corporal pertenecen a la categoría de *genes rectores*, pues controlan la expresión de varios genes subordinados siguiendo un definido orden jerárquico. Codifican *factores de transcripción específicos*, cuyas moléculas proteicas suelen ser bastante diferentes entre sí. No obstante, casi todas tienen en común un tramo de 60 aminoácidos muy parecido, al que se le ha dado el nombre de *homeodominio*. Es que los genes que codifican esos factores poseen en sus ADN una secuencia de 180 pares de nucleótidos, conocida como *caja homeótica*, con muy pocas variaciones entre un gen y otro. Esta caja fue descripta por primera vez en los genes homeóticos, de ahí su denominación. Se ha comprobado que los factores de transcripción con homeodominios se unen al surco mayor del ADN de los reguladores de los genes a través de estructuras moleculares del tipo hélice-vuelta-hélice (cap. 12-11) (figs. 12-5 y 12-6).

Se han encontrado genes con caja homeótica en todas las especies estudiadas —incluido el hombre—, ordenados en los cromosomas de modo semejante a los de la *Drosophila*. Tal descubrimiento ha llevado a la idea de que los mecanismos responsables del desarrollo del plan corporal se hallan difundidos en la mayor parte de los organismos multicelulares, incluidos los vertebrados. Refuerza esta hipótesis el hecho de que en los embriones de los vertebrados se expresan varios genes con caja homeótica en las células del tubo neural y de los somitas, órganos que presentan una organización metamérica y pueden ser considerados análogos a los segmentos de la *Drosophila*. No obstante, las extrapolaciones en torno de este punto deben efectuarse con cautela, por un lado, porque para muchos tal analogía no existe y, por otro, porque en el armado del modelo que lleva a la formación del cuerpo de los vertebrados prevalecerían los fenómenos inductivos.

INMUNOLOGIA MOLECULAR

18-24. En la diferenciación de los linfocitos se produce un reordenamiento de ciertos genes

Los organismos son continuamente invadidos por sustancias extrañas o *antígenos*, muchos de los cuales —como los microorganismos— pueden ser letales si no son eliminados. Para ello, los organismos producen *anticuerpos* que se unen a los antígenos y los destruyen. La figura 18-12 muestra la estructura de la molécula de un anticuerpo, formada por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas unidas por puentes disulfuro (–S–S–). Cada cadena liviana o pesada incluye dos regiones: una variable (V), que difiere en los distintos anticuerpos, y otra constante (C), que suele ser la misma en la mayoría de los anticuerpos.

La composición de las regiones variables de ambas cadenas, llamadas V_L y V_H , determina las propiedades del sitio de combinación del anticuerpo con el antígeno. La región constante de la cadena pesada (C_H) determina otras propiedades de la molécula, relacionadas con la eliminación del antígeno. Esta región exhibe tres dominios (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}) con una secuencia de aminoácidos parecida y que aparentemente surgieron durante la evolución a través de duplicaciones de una corta secuencia de nucleótidos en el ADN. Esos dominios, incluida una región llamada *bisagra* (fig. 18-12), son codificados por el gen respectivo en tres exones diferentes y luego éstos son empalmados tras la eliminación de los intrones en el ARNm. Así, las moléculas de los anticuerpos proporcionan uno de los mejores ejemplos de cómo pueden reunirse diferentes dominios funcionales en las proteínas por el mecanismo de escisión y empalme del ARNm (cap. 12-17).

Se estima que el ratón tiene un repertorio de por lo menos 2×10^7 sitios de recombinación de anticuerpos diferentes, y que el genoma de este animal puede —sin recurrir a mecanismos de síntesis de ARNm especiales— codificar en total sólo 10^6 anticuerpos. La presencia de *regiones variables* en las cadenas livianas y pesadas de los anticuerpos hizo sospechar —y luego se confirmó— que tales cadenas no eran codificadas en lugares contiguos en el ADN, y que la gran variedad de anticuerpos era el resultado de múltiples posibilidades de combinaciones entre las secuencias de la región variable y la secuencia de la región constante. Al disponer de la posibilidad de clonación y secuenciamiento del ADN, los biólogos moleculares pudieron desentrañar la manera como se reordenan los genes de las regiones variables y constantes para originar esa diversidad.

Los anticuerpos son producidos por los *linfocitos B*, que se diferencian en la médula ósea (su nombre obedece a que en las aves lo hacen en la bolsa de Fabricio), en contraste con los *linfocitos T*, que derivan del timo y poseen otras funciones en la respuesta inmunológica.

Comencemos por el análisis de los *genes de la cadena pesada*. En las células del ratón existen ocho tipos de secuencias para la región constante de esta cadena, llamadas μ , δ , γ_3 , γ_1 , γ_{2b} , γ_{2a} , ϵ y α , correspondientes a las inmunoglobulinas IgM, IgD, IgD₃, IgG₁, IgG_{2b}, IgG_{2a}, IgE e IgA, respectivamente (sección 18-26) (fig. 18-13). La región variable está integrada por tres segmentos, llamados V (por “variable”), D (por “diversidad”) y J (por “juntura”). Estos se encuentran localizados a una distancia de miles de nucleótidos del gen de la región constante, en el mismo cromosoma. Existen unos

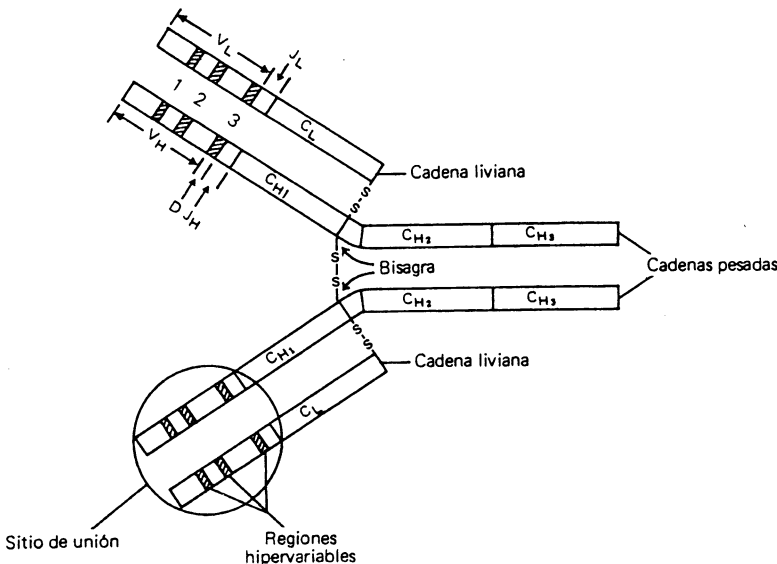


FIG. 18-12. Dibujo esquemático de la molécula de la inmunoglobulina G. C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_L son los dominios de las regiones constantes de la cadena pesada (H) y liviana (L). También se muestran las partes de la región variable de la cadena liviana (V_L y J_L) y de la cadena pesada (V_H , D_H y J_H).

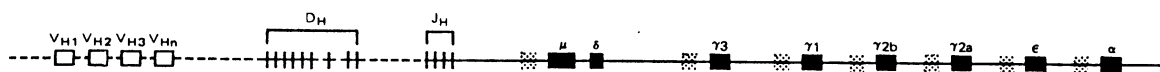


FIG. 18-13. Gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

500 genes diferentes para la región V, 12 para la D y 4 para la J.

Cuando un linfocito B inmaduro es comprometido a elaborar un anticuerpo para un antígeno dado, a nivel de su ADN se combinan tres de estos genes —uno V, uno D y uno J—, lo cual se logra mediante la remoción de los genes V, D y J (y los intrones) situados entre ellos. El término “remoción” es literal, pues estos tramos de ADN son eliminados por cortes y empalmes semejantes a los que usa la célula para remover los intrones en los transcritos primarios (cap. 12-17). Debe señalarse que el fenómeno de pérdida de secuencias en el ADN que se da en la diferenciación de los linfocitos B *no se presenta en ningún otro tipo celular*. Los genes J situados entre el J seleccionado y el gen C (de la cadena constante) son transcritos, pero posteriormente removidos del transcripto primario por cortes y empalmes, de modo que en el ARNm de la cadena pesada las secuencias V, D, J y C quedan contiguas. Como las regiones V, D y J pueden recombinarse al azar, su reordenamiento en la cadena pesada podría generar por lo menos 24.000 clases de cadenas pesadas diferentes:

$$V(500) \times D(12) \times J(4) \times C(1) = 24.000$$

Por su lado, los *genes de la cadena liviana* —localizados en otro cromosoma— se reordenan en forma similar a los de la cadena pesada, salvo que exhiben unas 300 variantes para el segmento V y carecen de segmento D. En consecuencia, los segmentos V y J de la cadena liviana pueden generar unas 1.200 clases de moléculas diferentes:

$$V(300) \times J(4) \times C(1) = 1.200$$

Puesto que el sitio de combinación para el antígeno es el resultado de la combinación de una región V_H con una V_L , los genes codificadores de anticuerpos pueden generar tantas moléculas de anticuerpos diferentes como la cifra que surge de la multiplicación de ambos valores.

En realidad, la diversidad es aún mayor porque el lugar de recombinación en la cadena liviana entre V y J puede variar en unos cuantos nucleótidos y producir moléculas con aminoácidos diferentes en la zona de juntura. Con esta diversidad adicional el número de anticuerpos posibles se aproxima a los potencialmente generados por el organismo.

Cada subclase de linfocito produce un solo tipo de anticuerpo, determinado por los fenómenos de recombinación. Sin embargo, a lo largo de la vida

de la célula puede generarse una mayor diversidad por la aparición de mutaciones somáticas, que producen cambios adicionales en los segmentos V e introducen de tal forma ajustes más precisos en la afinidad de un anticuerpo por su correspondiente antígeno.

18-25. Existe una IgM unida a la membrana plasmática de los linfocitos y una IgM que se secreta

Después que un linfocito B ha experimentado el reordenamiento de los segmentos que participan en la codificación de su anticuerpo, lo expresa —como IgM— en su membrana plasmática. El linfocito permanece inmunológicamente latente hasta que el antígeno específico ingresa en el organismo y se une a la IgM de su membrana, lo cual induce su proliferación. Esta proliferación genera un clon de linfocitos que elaboran el mismo tipo de anticuerpo. Así, el sistema inmunológico actúa por *selección clonal*, es decir, por proliferación de los linfocitos B que poseen en su superficie un anticuerpo (IgM) capaz de unirse específicamente al antígeno ingresado.

Una vez que los linfocitos han sido estimulados por el antígeno, comienzan a secretar la IgM. Este pasaje de IgM unida a la membrana plasmática a IgM secretada es generado por un cambio en el *procesamiento del transcripto primario* de esa IgM (cap. 12-19). Como se aprecia en la figura 18-14, la forma unida a la membrana es codificada por un ARNm que tiene dos exones extra cerca de su extremo poli A. Ello le confiere a la proteína una región altamente hidrofóbica en su terminal COOH, que liga la IgM a la membrana del retículo endoplasmático, desde donde es transferida a la membrana plasmática. Después de la estimulación ejercida por el antígeno, el ARNm es poliadenilado en un punto anterior del transcripto primario, lo cual elimina a los exones extra y, en consecuencia, la región terminal COOH hidrofóbica en la IgM, que por lo tanto será secretada.

18-26. Las inmunoglobulinas tienen distintas funciones de acuerdo con el tipo de cadena pesada de sus moléculas

Estimulados por el antígeno, los linfocitos B proliferan y se transforman en células muy especializadas, denominadas *plasmocitos*, que poseen un re-

tículo endoplasmático rugoso muy desarrollado y son capaces de secretar hasta mil moléculas de anticuerpo por segundo. Como vimos, los linfocitos descendientes de un mismo clon tienen regiones variables idénticas. En cambio, en algunos linfocitos de un clon dado pueden producirse modificaciones en algunos sectores de la *región constante de la cadena pesada*, por lo cual, en lugar de IgM, secretarán otras clases de anticuerpos, como IgD, IgG, IgE o IgA (sección 18-24). Tales variantes confieren distintas propiedades a los anticuerpos. Por ejemplo, la IgG fija el *complemento* —nombre de un conjunto de proteínas séricas que destruyen a los microorganismos—. La IgE se une a ciertos receptores de membrana de las células cebadas, las cuales contienen grandes cantidades de histamina —por lo que la unión con el antígeno provoca diversas reacciones alérgicas—. Por su parte, la IgA se expresa en los epitelios. Estos cambios en la región constante de la inmunoglobulina se producen por la delección de secuencias de nucleótidos en los genes de esa región de la cadena pesada (fig. 18-13).

18-27. Ciertos tipos de fusión celular permiten obtener líneas celulares secretoras de anticuerpos puros de gran importancia médica

Como vimos, los anticuerpos son moléculas proteicas capaces de reconocer y unirse específicamente a un antígeno, es decir, a una molécula o a una partícula extraña al organismo. Así, cuando un

animal es inyectado con una molécula o varias moléculas ajenas a su organismo (por ejemplo, proteínas o polisacáridos complejos), al cabo de varios días produce anticuerpos específicos que interactúan con ese o con esos antígenos. Más aún, los anticuerpos aparecen en el plasma sanguíneo del animal inmunizado y cada uno reconoce una parte de la molécula antigénica inyectada (si su tamaño es grande) o toda la molécula (si fue inyectada más de una y es pequeña).

Mediante técnicas de *fusión celular* se han podido crear líneas celulares que producen cantidades ilimitadas de determinados anticuerpos. Vimos que éstos son generados por los linfocitos B, y debe recordarse que existen tantas subclases de linfocitos B como anticuerpos produce el organismo. Dicho en otros términos, cada subclase de linfocito B da origen a un solo tipo de anticuerpo. Además, para elaborar mayores cantidades de anticuerpo, el linfocito B se transforma en plasmocito.

Los linfocitos no se reproducen en medios de cultivo, pero se ha desarrollado una técnica por la cual es posible multiplicarlos indefinidamente partiendo de un único linfocito fusionado con una célula tumoral. La figura 18-15 muestra de qué manera pueden obtenerse anticuerpos a partir de un clon de linfocitos B pertenecientes a una determinada subclase (por derivar de un solo clon, estos anticuerpos han recibido el nombre de *monoclonales*). Se inmuniza un ratón con el antígeno cuyo anticuerpo se desea producir, se extraen los linfocitos del bazo y se los fusiona mediante el virus

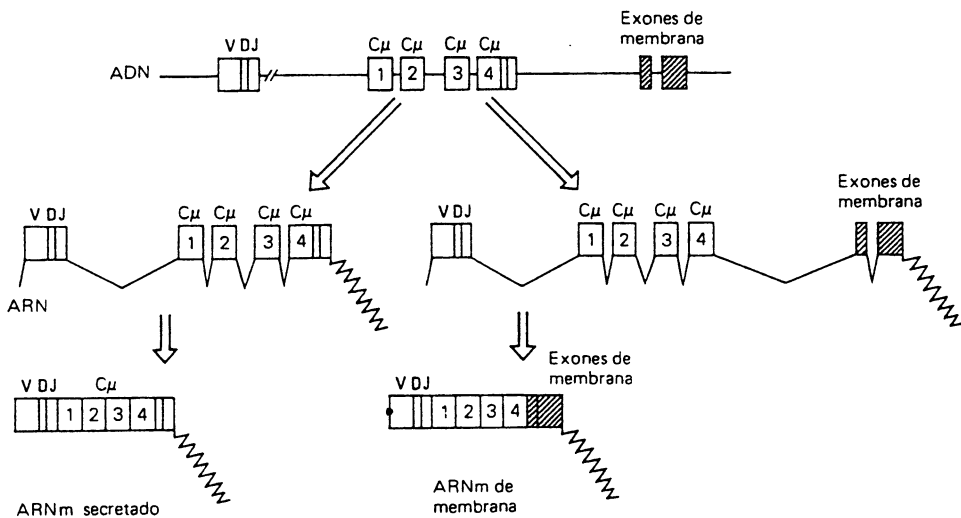


FIG. 18-14. Procesamiento del ARNm de una inmunoglobulina M (IgM) que es secretada y de otra que permanece en la membrana del linfocito B. Obsérvese que la forma membranosa tiene dos exones extra en el extremo cercano al poli A, los cuales dan origen a aminoácidos muy hidrófobos. Esta región hidrofóbica (que se encuentra cerca del terminal COOH de la proteína) sirve para fijar la IgM a la membrana. Cuando se estimula la producción de IgM solubles mediante los antígenos correspondientes, durante la transcripción se eliminan los exones membranosos y la inmunoglobulina es secretada, ya que no posee la región hidrofóbica.

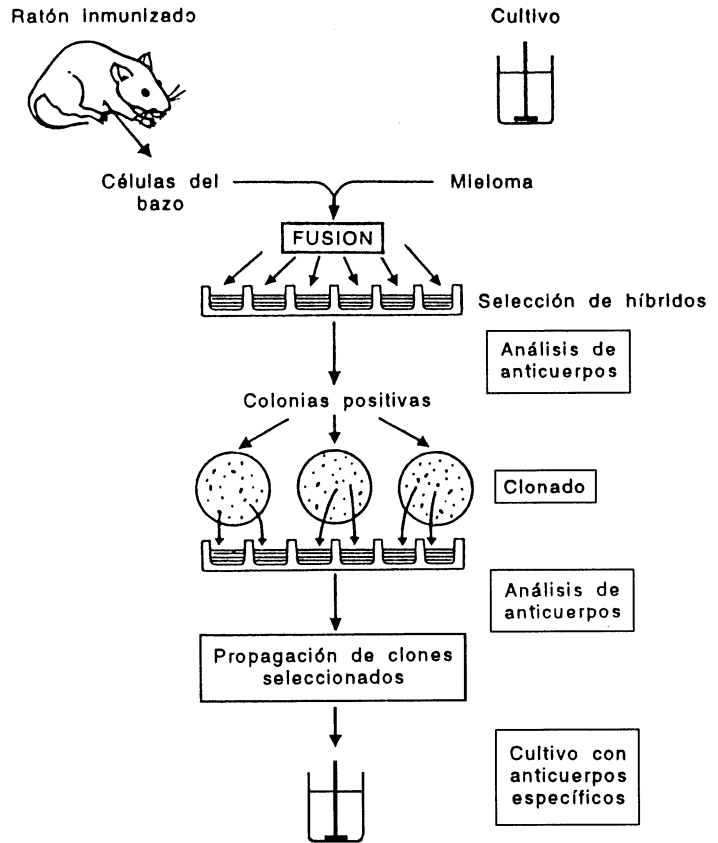


FIG. 18-15. Producción de anticuerpos monoclonales. La célula híbrida produce un solo tipo de anticuerpo porque pertenece a una colonia (clon) que se formó a partir de un antecesor común. (Cortesía de C. Milstein.)

Sendai con células de ratón cultivadas, derivadas de plasmocitos provenientes de ciertos *mielomas* (tumores que invaden la médula ósea). Los híbridos resultantes crecen en medios de cultivo, y los clones que secretan el anticuerpo deseado pueden ser identificados, aislados y puestos a crecer independientemente. La fusión con las células tumorales vuelve inmortal a los linfocitos del bazo de ratón, que entonces crecen en forma indefinida en el medio de cultivo. Como todos los linfocitos derivan de un antecesor común, los anticuerpos (monoclonales) que producen son de alta pureza.

Se utilizan anticuerpos monoclonales para: 1) prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades infecciosas; 2) clasificar antígenos de histocompatibilidad humanos; 3) purificar y producir en escala industrial productos proteicos obtenidos de bacterias mediante técnicas de ingeniería genética (por ejemplo, el interferón).

Como vemos, la práctica de la fusión celular, que se desarrolló para estudiar las relaciones entre el núcleo y el citoplasma, ha dado lugar a un instrumento inmunológico de incalculable importancia médica para la humanidad.

MUERTE CELULAR

18-28. La muerte celular es un fenómeno común en los organismos

La muerte de las células es un fenómeno común durante el desarrollo embrionario, utilizado para eliminar tejidos provisionarios (por ejemplo, las membranas interdigitales durante la formación de los dedos), remover células superfluas (por ejemplo, casi la mitad de las neuronas formadas durante la neurogénesis), generar conductos u orificios orgánicos, etc. También se produce en gran escala en el organismo adulto, cuando es necesario remover cé-

lulas innecesarias, dañadas, envejecidas (por ejemplo, neutrófilos), redundantes (a fin de mantener un adecuado número de células) o potencialmente peligrosas para el organismo, como las tumorales, las infectadas, las autorreactivas (por ejemplo, los linfocitos T que atacan al propio organismo), etcétera.

Puesto que las células destinadas a morir perecen para que sobrevivan las restantes células del organismo, puede decirse que protagonizan una suerte de suicidio biológico con fines altruistas. Estas muertes celulares deliberadas o fisiológicas

—muchas de las cuales se hallan programadas— reciben el nombre de *apoptosis*, término que se usa para diferenciarlas de las muertes celulares accidentales (por traumatismos, sustancias tóxicas, problemas vasculares, etc.), conocidas como *necrosis*.

18-29. La muerte celular programada suele desencadenarse ante la ausencia de ciertos factores externos

En las células programadas para morir se activaría una suerte de reloj biológico gobernado por genes que codificarían la síntesis de moléculas letales para las propias células. Estas moléculas ejercerían su acción al desencadenar una cascada de reacciones en el núcleo y en el citoplasma, que finalmente llevan a las células a la muerte. No obstante, en muchos casos la puesta en marcha de este proceso no sería automática, ya que parece depender de la supresión de ciertos factores tróficos provenientes del exterior (inductores) que mantienen vivas a las células. De acuerdo con el tipo celular, estos factores provienen de células vecinas (secreción paracrina), como en el caso de la mayoría de los factores de crecimiento, o de células distantes, a través de la sangre (secreción endocrina), como en el caso de la eritropoyetina y las hormonas en general (cap. 15-17).

18-30. Los cambios celulares que se producen durante la apoptosis son característicos

Los cambios morfológicos que experimentan las células durante la apoptosis son característicos. Se dan en este orden (fig. 18-16): 1) se compacta la

cromatina y se desarma el citoesqueleto, de modo que la célula pierde contacto con sus vecinas (o con la matriz extracelular) y se vuelve esférica; 2) las moléculas de ADN se fragmentan debido a que son cortadas en varios puntos por una *endonucleasa* (estos cortes se producen a nivel del ADN internucleosómico); 3) el citosol y los orgánoides se condensan, aunque estos últimos, incluidos los lisosomas, permanecen intactos; 4) los cortes en las moléculas de ADN llevan a la fragmentación del núcleo, que se reparte en el citoplasma bajo la forma de numerosos fragmentos de cromatina compactada; 5) en la superficie de la célula aparecen protrusiones, cada una de las cuales está formada por un sector del citoplasma que envuelve a alguno de los fragmentos nucleares; 6) estas protrusiones, a medida que se desprenden de la superficie celular, se convierten en las llamadas *vesículas apoptóticas*, con derivados nucleares y componentes citoplasmáticos todavía bien conservados en su interior; 7) finalmente, las vesículas apoptóticas son fagocitadas por macrófagos y otras células vecinas. Contrariamente a lo que ocurre en la necrosis, la remoción de células por apoptosis se produce sin que haya reacciones inflamatorias ni alteración de la arquitectura tisular.

18-31. Los mecanismos moleculares de activación de la apoptosis varían en los distintos tipos celulares

Los mecanismos moleculares de activación de la apoptosis varían con los tipos celulares. En algunas células el proceso es automático, como en los neutrófilos envejecidos (estas células tienen una vida media relativamente breve). En otras, como vimos,

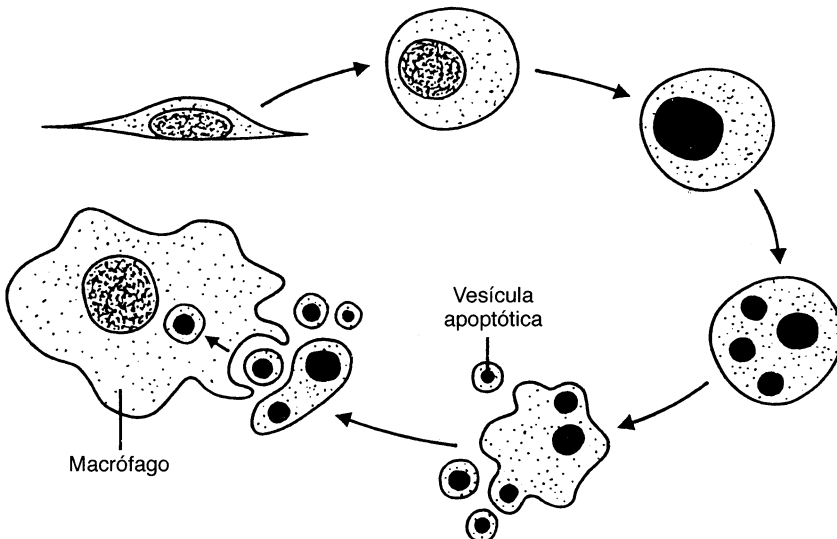


FIG. 18-16. Cambios celulares que se producen durante la apoptosis. Obsérvese la fagocitosis de las vesículas apoptóticas por macrófagos.

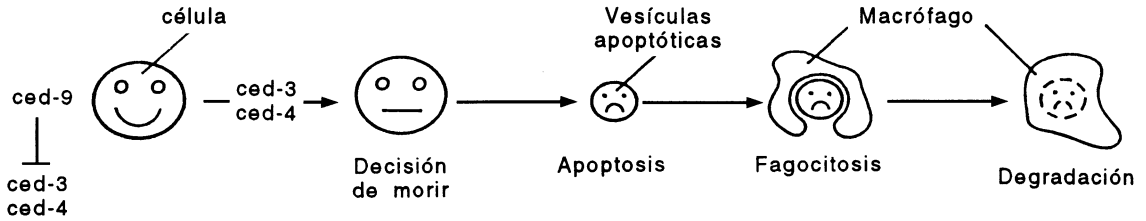


FIG. 18-17. Control genético de la muerte celular programada.

el proceso se desencadena cuando desaparecen determinados factores tróficos. Se cree que en ambos casos se activa la fosfolipasa C, lo cual provoca —por vía del inositol trifosfato (IP_3)— la salida de Ca^{2+} del retículo endoplasmático al citosol. A su turno, el Ca^{2+} activa tanto la disociación de los filamentos de actina del citoesqueleto como a la endonucleasa que provoca la fragmentación del ADN.

18-32. La muerte celular programada es dirigida por genes

La muerte celular programada es controlada genéticamente, como ocurre con la diferenciación y la proliferación celulares. El modelo mejor estudiado proviene del nematodo *Caenorhabditis elegans*, que muestra la acción de por lo menos tres genes en los procesos de muerte celular durante su transformación de larva a gusano adulto. La actividad de dos de esos genes, el *ced-3* y el *ced-4* (por *cell death*), es necesaria para la iniciación de las muertes celulares, mientras que el gen *ced-9* contrarresta tal efecto, ya que es requerido para proteger a las células que deben sobrevivir (fig. 18-17).

En las células existen otros genes que, a través de sus productos proteicos, intervienen en el control de la muerte celular. Por ejemplo, la proteína Bcl-2, derivada del protooncogén *bcl-2*, es un potente represor de la apoptosis, especialmente en los linfocitos; esta proteína es homóloga a la codificada por el gen *ced-9* en el *Caenorhabditis elegans*. En cambio, la proteína Myc, derivada del protooncogén *myc*, promueve, según las circunstancias, la muerte de las células o su proliferación (cap. 15-30). Como vimos en el capítulo 15-28, la proteína p53, producida por el gen *supresor de tumores p53*, estabiliza a la célula en la fase G1 del ciclo a fin de controlar la existencia de daños en el ADN; si éstos fueran peligrosos para las futuras células hijas, la célula progenitora es destruida por apoptosis por la misma proteína p53. Las mutaciones del gen p53 hacen que la célula pierda este control, de modo que la célula con el ADN dañado continúa su ciclo y da lugar a una estirpe celular que va acumulando errores en su genoma, propicios para la generación de tumores (cap. 15-31).

BIBLIOGRAFIA

- Akam M. (1983) The location of ultrathorax transcripts in *Drosophila* tissue sections. *EMBO J.* 2:2075.
- Anderson K. (1995) One signal, two body axes. *Science* 269: 489.
- Balinsky B. I. (1981) *Introduction to Embryology*, 5th Ed. Saunders, Philadelphia.
- Bally-Cuif L. and Wassef M. (1995) Determination events in the nervous system of the vertebrate embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:450.
- Binder C. and Hiddemann D. (1994) Programmed cell death: many questions still to be answered. *Ann. Hematol.* 69: 45.
- Bissonnette R. P., Echeverri F., Mahboubi A. and Green D. R. (1992) Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 359:552.
- Boncinelli E. and Mallamaci A. (1995) Homeobox genes in vertebrate gastrulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:619.
- Briggs R. and King T. J. (1959) Nucleocytoplasmic interactions in eggs and embryos. In: *The Cell*. Academic Press, New York.
- Brown D. D. (1981) Gene expression in eukaryotes. *Science* 211:667.
- Carrasco A. E., McGinnis W., Gehring W. J. and De Robertis E. M. (1984) Cloning of a *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes. *Cell* 37:409.
- Cho K. W. Y., Blumberg B., Steinbeisser H. and De Robertis E. M. (1991) Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* development. *Development* 115: 573.
- Darnell J. E. (1982) Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* 297:365.
- Davidson E. H. (1976) *Gene Activity in Early Development*. Academic Press, New York.
- De Robertis E. M. and Gurdon J. B. (1979) Gene transplantation and the analysis of development. *Sci. Am.* 241:73.
- De Robertis E. M., Oliver G. and Wright C. V. E. (1990) Homeobox genes and the vertebrate body plan. *Sci. Am.* 263 (1):26.
- Dubnau J. and Struhl G. (1996) RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. *Nature* 379:694.
- Edelman G. M. (1992) Morphoregulation. *Dev. Dynam.* 193:2.
- Ellis R. E., Yuan J. V. and Horvitz H. R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:663.
- Fristrom D. (1988) The cellular basis of epithelial morphogenesis. *Tissue Cell* 20:645.
- Gerschenson L. E. and Rottello R. J. (1992) Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 6:2450.
- Gurdon J. B. (1968) Transplanted nuclei and cell differentiation. *Sci. Am.* 219 (6):24.
- Guthrie S. C. and Gilula N. B. (1989) Gap junctional communication and development. *Trends Neurosci.* 12:12.
- Hafen E., Levine M. and Gehring W. J. (1983) Transcripts of the homeotic antennapedia gene complex. *EMBO J.* 2: 617.

- Harris H. (1974) Nucleus and Cytoplasm. Clarendon Press, Oxford.
- Hib J. (1994) Embriología Médica. Interamericana/McGraw-Hill Inc., México D.F.
- Hynes R. O. and Lander A. D. (1992) Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 68:303.
- Illmensee K. and Hoppe P. C. (1981) Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23:9.
- Ingham P. W. (1988) The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* 335:25.
- Kelly S. J. (1977) Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J. Exp. Zool.* 200:365.
- Kessler D. S. and Melton D. A. (1994) Vertebrate embryonic induction: mesodermal and neural patterning. *Science* 266:596.
- Kirschner M., Newport J. and Gerhart J. (1985) The timing of early developmental events in *Xenopus*. *Trends Genet.* 1:41.
- Köhler G. and Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495.
- Lawrence P. A. (1981) The cellular basis of segmentation in insects. *Cell* 26:3.
- Leder P. (1982) The genetics of antibody diversity. *Sci. Am.* 246:72.
- Lemaire P. and Gurdon J. B. (1994) Vertebrate embryonic inductions. *Bioessays* 16:617.
- Lumsden A. (1990) The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. *Trends Neurosci.* 13:329.
- Lyon M. F. (1993) Epigenetic inheritance in mammals. *Trends Genet.* 9:123.
- McGinnis W., Garber R. L., Wirz H., Kuroiwa A. and Gehring W. J. (1984) A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37:403.
- McGinnis W. and Krumlauf R. (1992) Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68:283.
- McGinnis W. and Kuziora M. (1994) The molecular architects of body design. *Sci. Am.* 270 (2):36.
- McMahon A. P. (1992) The Wnt family of developmental regulators. *Trends Genet.* 8:236.
- Martin S. G., Green D. R. and Cotter T. G. (1994) Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *TIBS* 19:26.
- Milstein C. (1980) Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* 243:66.
- Morata G. and Lawrence P. A. (1977) Homeotic genes, compartments and cell determination in *Drosophila*. *Nature* 265:211.
- Morgan T. H. (1927) Experimental Embryology. Columbia University Press, New York.
- Müller M. M., Carrasco A. E. and De Robertis E. M. (1984) A homeobox-containing gene expressed during oogenesis in *Xenopus*. *Cell* 39:157.
- Nüsslein-Volhard C., Frohnhofer H. G. and Lehmann R. (1987) Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* 238:1675.
- Patel N. H. (1994) Developmental evolution: insights from studies of insect segmentation. *Science* 266:581.
- Peifer M. (1994) The two faces of hedgehog. *Science* 266:1492.
- Placzek M. (1995) The role of the notochord and floor plate in inductive interactions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:499.
- Pollack R. (1981) Readings in Mammalian Cell Culture. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Rebagliati M. R., Weeks D. L., Harvey R. P. and Melton D. A. (1985) Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. *Cell* 42:769.
- Ringertz N. R. and Savage R. E. (1976) Cell Hybrids. Academic Press, New York.
- St. Johnston D. and Nüsslein-Volhard C. (1992) The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68:201.
- Schneiderman H. A. (1976) New ways to probe pattern formation and determination in insects. In: *Insect Development*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Smith W. C., Knecht A. K., Wu M. and Harland R. M. (1993) Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing *Xenopus* mesoderm. *Nature* 361:547.
- Steller H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445.
- Strome S. and Wood W. B. (1982) Immunofluorescence visualization of germ-line-specific granules in embryos, larvae and adults of *C. elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1558.
- Tam P. P. L. and Quinlan G. A. (1996) Mapping vertebrate embryos. *Curr. Biol.* 6:104.
- Thomsen G. H. and Melton D. A. (1993) Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in *Xenopus*. *Cell* 74:433.
- Tickle C. (1995) Vertebrate limb development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:478.
- Vincent J. P., Oster G. F. and Gerhart J. C. (1986) Kinematics of gray crescent formation in *Xenopus* eggs: the displacement of subcortical cytoplasm relative to the egg surface. *Dev. Biol.* 113:484.
- Whittaker J. R. (1979) Cytoplasmic determinants of tissue differentiation in the Ascidian egg. In: *Determinant of Spatial Organization*. Academic Press, New York.

19/ La célula vegetal. Cloroplastos

Eduardo De Robertis y José Hib

19-1. Las células de las plantas son similares a las de los animales

La biología celular de las plantas es esencialmente similar a la de los animales, lo cual demuestra la unidad de estructura y función de la célula eucariota (fig. 1-7). No obstante, se justifica un capítulo para la célula vegetal a fin de abordar ciertos aspectos especiales, por ejemplo, la gruesa pared celular que cubre la membrana plasmática, particularidades del citoplasma, algunos organoides exclusivos —como los glioxisomas y los plástidos— y detalles singulares de la multiplicación celular y del modo como se reproducen las plantas. De los plástidos, los más importantes son los cloroplastos que, junto con las mitocondrias, constituyen maquinarias bioquímicas capaces de producir transformaciones energéticas. En el caso de los cloroplastos, atrapan la energía electromagnética derivada de la luz solar y la convierten en energía química mediante un proceso llamado fotosíntesis; luego utilizan esa energía para sintetizar alimentos a partir del CO₂ atmosférico.

LA PARED DE LA CELULA VEGETAL

19-2. La pared de la célula vegetal constituye una especie de exoesqueleto

La *pared celular* es una especie de exoesqueleto que le da protección y sostén mecánico a la célula vegetal y determina su forma. Ello incluye el mantenimiento del balance entre la presión osmótica intracelular y la tendencia del agua a penetrar en la célula. Si una célula vegetal se coloca en una solución cuya presión osmótica es semejante a la del medio intracelular, la membrana plasmática se mantiene adherida a la pared celular. Cuando la solución es más concentrada, la célula pierde agua

y el citoplasma se retrae. En cambio, en un medio menos concentrado (hipoosmótico), la célula se hincha y a la larga estalla.

El crecimiento y la diferenciación de las células vegetales dependen en gran medida de la organización de la pared celular. A partir de ésta se produce la diferenciación de las células del *cámbium*, de los vasos cribosos del *floema* (que sirven para el transporte de material desde las hojas) y de los vasos leñosos del *xilema*, que se lignifican.

19-3. La pared celular contiene un retículo microfibrilar

La estructura de la pared celular puede ser comparada con la de un plástico reforzado con fibras de vidrio, ya que está constituida por un retículo microfibrilar incluido en una matriz de moléculas unidas entre sí.

Las microfibrillas están compuestas principalmente por *celulosa* (el producto más abundante en la tierra). Se trata de cadenas rectas de polisacáridos formados por unidades de *glucosa* unidas por enlaces 1-4 β (fig. 19-1). Estas son las cadenas de *glucano*, que mediante uniones de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares producen la unidad estructural que se denomina *microfibrilla*, la cual tiene 25 nm de diámetro y está compuesta por casi 2.000 cadenas de glucano. Las microfibrillas, a su vez, se asocian entre sí y con proteínas y polisacáridos no celulósicos para formar la pared celular. La celulosa es sintetizada por una gran variedad de células, incluidas ciertas bacterias (como *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Rhizobium*), algas, hongos y plantas criptógamas y fanerógamas.

La matriz de la pared celular posee *lignina* y algunos polisacáridos. De éstos los principales son: 1) *sustancias pécticas* solubles en agua, que contienen galactosa, arabinosa y ácido galacturónico, y

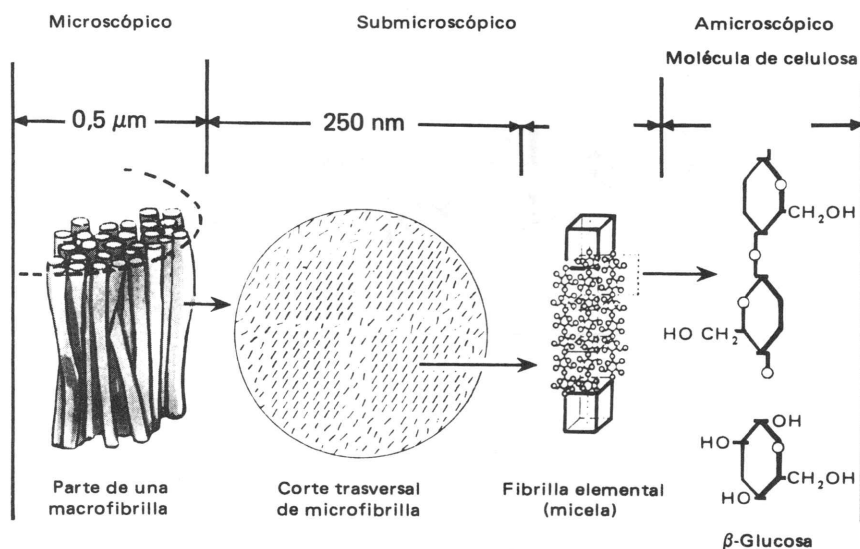


FIG. 19-1. Elementos estructurales de la celulosa en sus distintos niveles de organización. (De D. K. Mühlethaler.)

2) *hemicelulosas*, compuestas por glucosa, xilosa, manosa y ácido glucurónico. La lignina se encuentra sólo en las paredes de las células maduras y está formada por un polímero aromático que proviene de la polimerización de fenoles. Algunas paredes celulares pueden tener sustancias cuticulares (ceras) y depósitos minerales, como silicatos y carbonatos de sodio y de magnesio. En los hongos y levaduras la matriz de la pared celular contiene un polímero de la glucosamina, la *quitina*.

19-4. La pared celular se compone de una pared primaria y una secundaria

La pared celular es compleja y está muy diferenciada en ciertos vegetales. Suelen distinguirse una pared primaria y una pared secundaria, que se desarrollan en una secuencia especial y difieren por la composición de sus matrices y por la disposición de las microfibrillas.

La *pared primaria* comienza a formarse con la división celular a partir de una estructura llamada *placa celular*, que aparece durante la telofase en el plano ecuatorial entre las futuras células hijas. La placa está constituida por vesículas del complejo de Golgi, que se alinean en el plano ecuatorial de la célula y luego forman la capa intermedia de la futura pared celular; esta capa contiene sustancias pécticas. Posteriormente, cada una de las células hijas deposita otras capas, compuestas por pectina, hemicelulosa y un retículo laxo de microfibrillas orientadas transversalmente respecto del eje mayor de la célula, que en conjunto constituyen la citada pared primaria.

Recién cuando la célula alcanza su madurez aparece la *pared secundaria*, que comprende materiales agregados sobre la superficie interna de la pared primaria, sea como espesamientos localizados (vasos del xilema) o como un espesamiento homogéneo (tubos cribosos del floema). En ambos casos la pared queda formada por celulosa, hemicelulosa y escasas sustancias pécticas. La diferenciación ulterior del xilema es producida por la infiltración de lignina en los espesamientos localizados. En este caso el polímero hidrofóbico reemplaza al agua e infiltra a la matriz y a las microfibrillas. Cuando la pared se lignifica, la célula vegetal muere.

19-5. Los componentes de la pared celular se originan en el complejo de Golgi o en relación con la membrana plasmática

Se han descrito dos vías principales en la biogénesis de la celulosa y de otros componentes de la pared celular. Una comprende el complejo de Golgi y la otra está asociada directamente con la membrana plasmática.

La intervención del complejo de Golgi es evidente en ciertas algas cuya pared está formada por escamas. Estas tienen un material amorfo y un retículo microfibrilar radial asociado con otro espiral. Las membranas del complejo de Golgi polimerizan cadenas de glucosa a microfibrillas de celulosa por intermedio de *glucosiltransferasas*. Luego las microfibrillas se organizan en escamas y son liberadas en la superficie.

La membrana plasmática es el sitio más frecuente para la síntesis de celulosa, lo cual no descarta

las funciones esenciales que desempeñan el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi, ya que las glucosiltransferasas son sintetizadas en ribosomas asociados a ese retículo, pasan al complejo de Golgi y de ahí a la membrana plasmática, donde se produce la síntesis de las microfibrillas celulósicas.

Dijimos antes que en los hongos la pared celular está compuesta principalmente por quitina. Este polisacárido es sintetizado por la enzima *quitina sintetasa* en presencia del sustrato apropiado (UDP-acetilglucosamina). La enzima es activada por proteólisis y por la luz, que acelera la síntesis de quitina. Se ha encontrado quitina transferasa en organoides vesiculares de 40 a 70 nm de diámetro —los llamados *quitosomas*—, que parecen ser el vehículo principal para el aporte de la enzima a los sitios de síntesis en la superficie celular.

19-6. Los plasmodesmos son vías de comunicación entre células vegetales adyacentes

Otra característica de la mayoría de las células vegetales es la presencia de puentes de citoplasma que establecen continuidad entre las células adyacentes. Estos puentes —denominados *plasmodesmos*— atraviesan el espesor de la pared pecto-celulósica (fig. 1-7).

La presencia de plasmodesmos permite la libre circulación de líquidos y solutos, tan importantes para mantener la tonicidad de la célula vegetal, y posiblemente el paso de macromoléculas. Así, las paredes celulares no representan tabiques completos entre las células; éstas configuran un vasto sinicio encuadrado por el esqueleto formado por las membranas pectocelulósicas.

La aparición de plasmodesmos se relaciona con la de la placa celular, la cual es atravesada por vesículas y túbulos del retículo endoplasmático, que son los que determinan la localización de aquéllos.

Se ha sugerido que los plasmodesmos desempeñan un papel en la diferenciación celular. Por ejemplo, si una célula se alarga, el número de plasmodesmos se reduce a lo largo de su eje mayor, pero aumenta en los tabiques transversales.

EL CITOPLASMA DE LA CELULA VEGETAL

19-7. El citoplasma de la célula vegetal presenta algunas características singulares

En el capítulo 1 se mencionaron las semejanzas esenciales entre los citoplasmas de las células animales y vegetales. Consideraremos aquí algunas características especiales del citoplasma de las células vegetales.

En las células meristemáticas, las membranas del retículo endoplasmático son relativamente escasas y están enmascaradas por los numerosos ribosomas que llenan el citosol. Así, en las células indiferenciadas la mayoría de los ribosomas se hallan libres. El gran desarrollo del retículo endoplasmático durante la diferenciación celular se relaciona con la intensa hidratación que experimenta el citoplasma. Este proceso da lugar a enormes *vacuolas* que se llenan de líquido y que suelen confluir entre sí (fig. 1-7). Como resultado, el citosol a veces queda reducido a una fina capa por debajo de la membrana plasmática. Por otro lado, los plasmodesmos frecuentemente están atravesados por túbulos del retículo endoplasmático liso. En las células que se diferencian en tubos cribosos se forman engrosamientos de *callosa*, que es un polisacárido compuesto por moléculas de glucosa unidas por enlaces 1-3 β . La callosa se deposita sobre esos túbulos, de manera que éstos se relacionarían con la formación de los poros de los tubos cribosos. Como veremos, el retículo endoplasmático desempeña un papel esencial en la formación de los glioxisomas.

Como en las células animales, en las vegetales el complejo de Golgi es esencial para la secreción. Así, sus cisternas se llenan con productos secretorios, los cuales se concentran y finalmente se eliminan al exterior. Las vesículas secretorias son muy abundantes en las células que sintetizan mucílago. El complejo de Golgi participa en el transporte de proteínas de depósito, como la vinicilina y la legumina en los cotiledones de ciertas leguminosas y la zeína en el endosperma del maíz. Estas y otras proteínas se localizan en organoides especiales, denominados *cuerpos proteicos* o *granos de aleurona*.

Los microtúbulos, en las regiones citoplasmáticas vecinas a los puntos donde se depositan las microfibrillas de la pared secundaria, están orientados en sentido tangencial. De tal modo, estos elementos del citoesqueleto parecen desempeñar un importante papel morfogénico, ya que proporcionan información precisa para determinar los lugares de depósito de sustancias en la pared celular. Esta, a su vez, determina la división de la célula, la forma y otros aspectos de la diferenciación celular.

19-8. Los glioxisomas son peroxisomas relacionados con el metabolismo de los triglicéridos

La germinación de las semillas suele acompañarse de la degradación de los acúmulos de lípidos en el endosperma. Durante este proceso se forman los *glioxisomas*, que son organoides (peroxisomas) relacionados con el metabolismo de los triglicéridos. Tienen una membrana y una matriz amorfa, en la que se encuentran diversas enzimas. Lo mismo que

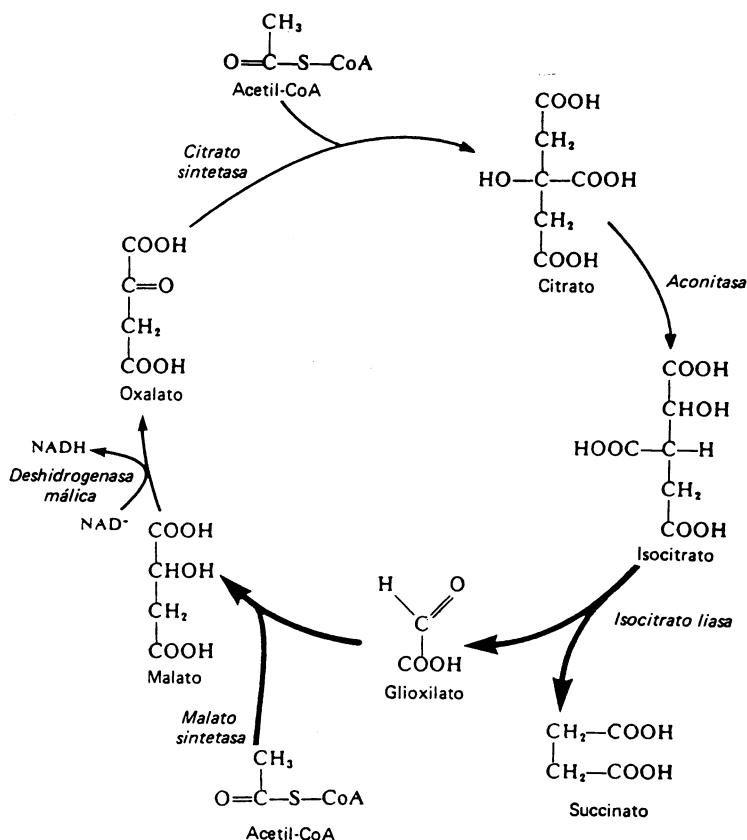


FIG. 19-2. Ciclo del glioxilato. Con líneas gruesas se indican las etapas especiales que lo diferencian del ciclo de Krebs.

en los peroxisomas (cap. 9-34), las enzimas glioxisómicas se forman en el citosol en los ribosomas libres y luego son transferidas al organelo, y los lípidos de la membrana son aportados por el retículo endoplasmático.

El glioxisoma contiene enzimas que se utilizan para transformar los lípidos de la semilla en hidratos de carbono por la vía del ciclo del glioxilato, que es una versión diferente del ciclo de Krebs (fig. 19-2). La ecuación al cabo de sus reacciones es:



La diferencia con el ciclo de Krebs radica en que el ciclo del glioxilato utiliza dos enzimas auxiliares —isocitrato liasa y malato sintetasa— y requiere dos moléculas de acetil CoA. Sus otras tres enzimas —citrato sintetasa, aconitasa y malato deshidrogenasa— intervienen también en el ciclo de Krebs.

Cuando las semillas germinan se producen cambios importantes en la síntesis de las enzimas glioxisómicas. Si se hace un fraccionamiento del endosperma en distintos períodos, se observa que la malato sintetasa pasa de la fracción que contiene el retículo endoplasmático a la de los glioxisomas. Estas observaciones favorecen la teoría de que los glioxisomas se originan en el retículo endoplasmático, aunque sus enzimas se formen en el citosol.

19-9. En la fotorrespiración que tiene lugar en las hojas verdes interviene un tipo especial de peroxisoma

Las células de las hojas verdes poseen peroxisomas que, mediante una oxidasa, catalizan la oxidación de un producto de dos carbonos —el ácido glucólico—, sintetizado en presencia de luz por los cloroplastos. Este proceso, en el que participan dos organelos —el cloroplasto y el peroxisoma—, se denomina *fotorrespiración* debido a que necesita luz, utiliza O₂ y libera CO₂ para la síntesis del ácido glucólico.

EL CLOROPLASTO Y OTROS PLASTIDOS

19-10. Los plástidos son los organelos más característicos de la célula vegetal

Los *plástidos* son organelos citoplasmáticos especiales que están presentes en las células vegetales. Los más importantes son los *cloroplastos*, que se caracterizan por poseer pigmentos —como clorofilas y carotenoides— y por su papel en la fotosíntesis.

Además de los cloroplastos, existen otros plástidos con pigmentos, que se agrupan con la denominación genérica de *cromoplastos*. En los pétalos, frutos y raíces de ciertas plantas superiores hay cromoplastos amarillos o anaranjados. Estos tienen, en general, menor contenido de clorofila y, por lo tanto, menor actividad fotosintética. El color rojo del tomate maduro se debe a la presencia de cromoplastos, cuyo pigmento rojo (licopeno) pertenece al grupo de los carotenoides. En las algas se encuentran cromoplastos que contienen diversos pigmentos, como la ficoeritrina y la ficocianina.

Los plástidos incoloros, o *leucoplastos*, se encuentran en las células embrionarias y en las células de los órganos que no reciben luz. Los plástidos localizados en los cotiledones y en los esbozos foliares del tallo al principio son incoloros, pero luego comienzan a acumular clorofila y adquieren el color verde característico de los cloroplastos. Sin embargo, en las células diferenciadas se encuentran leucoplastos verdaderos que nunca se vuelven verdes. Algunos leucoplastos, llamados *amiloplastos*, producen y acumulan gránulos de almidón. Carecen de ribosomas, tilacoides y pigmentos, y son muy abundantes en las raíces y los tubérculos de ciertas plantas.

Los cloroplastos son los plástidos más comunes y los de mayor importancia biológica. Por el proceso de fotosíntesis producen oxígeno y la mayor parte de la energía química que es utilizada por los organismos vivos. La vida se mantiene gracias a los cloroplastos. Sin ellos no habría plantas ni animales, ya que éstos se alimentan de lo producido por los vegetales, y puede decirse que cada molécula de oxígeno usada en la respiración y cada átomo de carbono presente en sus cuerpos pasaron alguna vez por un cloroplasto.

Desde el punto de vista evolutivo, los primeros seres vivos fueron anaerobios y aparecieron por lo menos mil millones de años antes de la fotosíntesis. Esta primero surgió en los procariotas y luego en los eucariotas. Con la liberación del oxígeno como un producto secundario de la fotosíntesis, la atmósfera se tornó rica en él y los organismos anaerobios pasaron a formar una ínfima minoría.

19-11. Las características de los cloroplastos varían en los distintos tipos celulares

Los cloroplastos se localizan principalmente en las células del mesófilo, tejido que se encuentra en las hojas de las plantas superiores y en las algas. Cada célula contiene un número considerable de cloroplastos, de forma esférica, ovoide o discoide. Su tamaño varía considerablemente, pero en promedio tienen un diámetro de 4 a 6 μm . Esta medida suele ser constante para cada tipo celular, aun-

que es mucho mayor en las células poliploides que en las diploides. En general, en las plantas que crecen en la sombra los cloroplastos son más grandes y más ricos en clorofila.

El número de cloroplastos se mantiene relativamente constante en los diversos vegetales. Las algas poseen a menudo un solo cloroplasto muy voluminoso. En las plantas superiores existen entre 20 y 40 por célula. En las hojas de algunas especies se ha calculado que hay alrededor de 400.000 cloroplastos por mm^2 de superficie. Si su número es insuficiente, aumentan por división; cuando es excesivo, se reducen por degeneración.

En cloroplastos aislados de espinaca se han verificado cambios de forma y volumen por acción de la luz. El volumen disminuye notablemente cuando son iluminados, aunque este efecto es reversible.

19-12. La estructura de los cloroplastos incluye la envoltura, la estroma y los tilacoides

El microscopio óptico ya había demostrado que los cloroplastos tienen una estructura heterogénea, compuesta por pequeños gránulos —a los que se les dio el nombre de *grana*— incluidos en una matriz homogénea o *estroma* (figs. 19-3 y 19-4). El microscopio electrónico ha revelado la estructura del cloroplasto, con sus tres componentes principales: la envoltura, la estroma y los tilacoides.

La *envoltura* de los cloroplastos presenta dos membranas, una externa y otra interna, a través de las cuales se producen los intercambios moleculares con el citosol. En el cloroplasto maduro no se observa continuidad de la membrana interna con los tilacoides. Ambas membranas carecen de clorofila, pero tienen un color amarillo por la presencia de pigmentos carotenoides. Contienen solamente el 2% de la proteína total del cloroplasto.

La *estroma* representa la mayor parte del cloroplasto y en ella se encuentran inmersos los tilacoides. Está compuesta principalmente por proteínas. Contiene ADN y también ARN, que intervienen en la síntesis de algunas de las proteínas estructurales y enzimáticas del cloroplasto. Es en la estroma donde se produce la fijación del CO_2 —es decir, la elaboración de hidratos de carbono—, así como la síntesis de algunos ácidos grasos y proteínas.

Los *tilacoides* constituyen sacos aplanados agrupados como pilas de monedas. Cada pila de tilacoides lleva el nombre de *granum* (plural: *grana*). Pero además hay tilacoides que atraviesan la estroma y que parecen conectar entre sí a dos tilacoides pertenecientes a otros tantos grana (figs. 19-4 y 19-5). A los elementos individuales situados en las pilas se los llama *tilacoides de los grana*, mientras

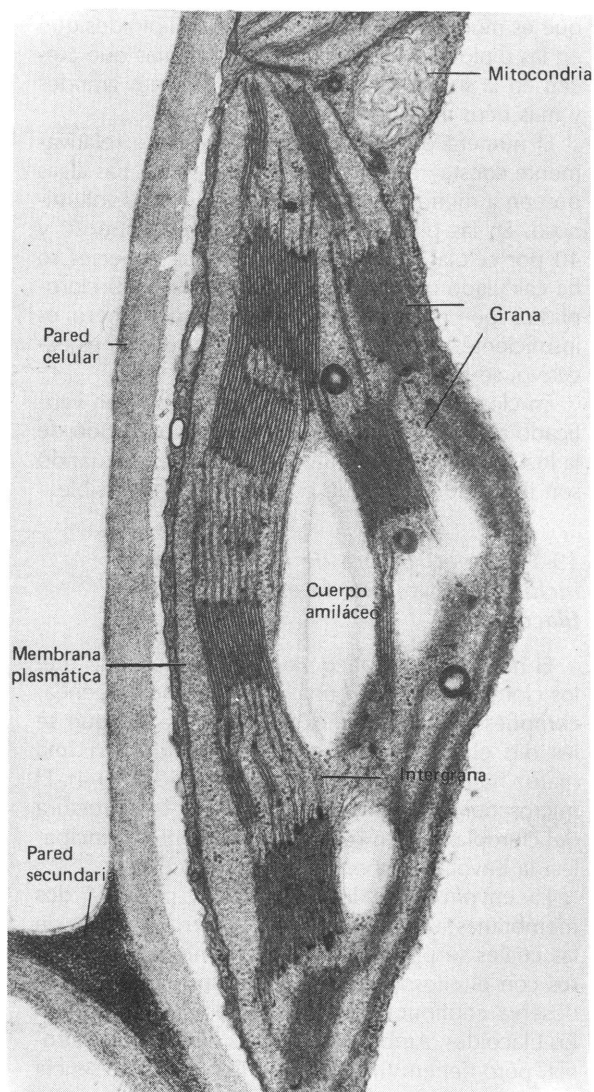


FIG. 19-3. Corte longitudinal de un cloroplasto que muestra los grana y los tilacoides de la estroma (intergrana). (Cortesía de M. Cresti y M. Wurtz.)

que a los conectores se los denomina *tilacoides de la estroma*. No obstante, la descripción antedicha es engañosa, ya que en rigor existen tilacoides pequeños, que poseen un diámetro promedio de $1\ \mu\text{m}$ (la mayoría de los tilacoides de los grana), y tilacoides grandes y alargados, en los que se distinguen tres sectores: los correspondientes a sus extremos, que son parte integrante de sendos grana, y un segmento intermedio, que representa a uno de los llamados tilacoides de la estroma (figs. 19-4 y 19-5).

La pared de los tilacoides —llamada *membrana tilacoide*— es una bicapa lipídica poblada de pro-

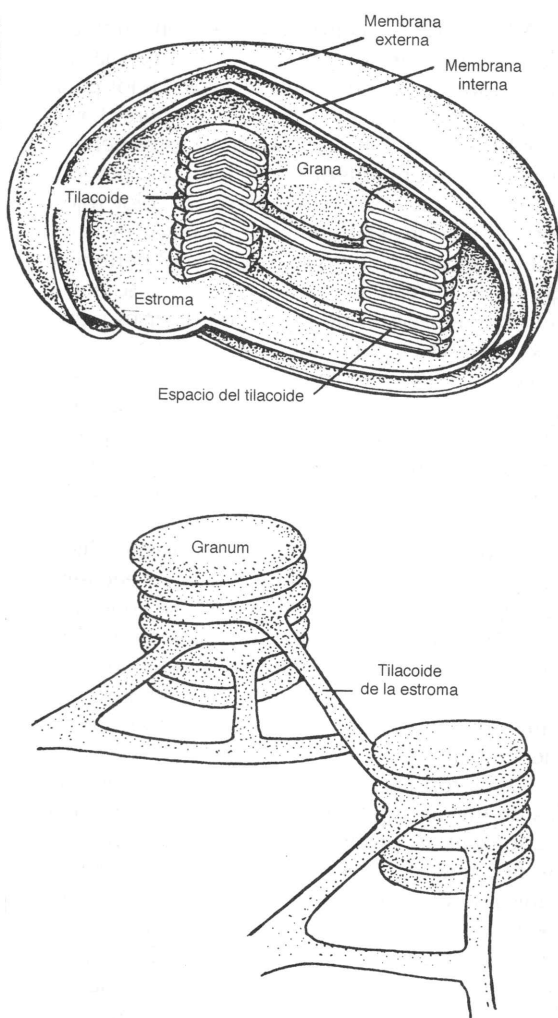


FIG. 19-4. Arriba. Esquema tridimensional de un cloroplasto que muestra sus principales componentes. Abajo. Esquema tridimensional de dos grana y de tilacoides que atraviesan la estroma del cloroplasto.

teínas y otras moléculas, casi todas involucradas en las reacciones químicas de la fotosíntesis. Esta pared separa el compartimiento de los tilacoides —es decir, el *espacio tilacoide*— de la estroma. Algunas evidencias parecen indicar que, directa o indirectamente, las luces de todos los tilacoides se hallan interconectadas entre sí, de modo que existiría un solo espacio tilacoide (fig. 19-6). Por lo tanto, el cloroplasto presentaría tres compartimientos: el intermembranoso (entre las membranas externa e interna), la estroma (entre la membrana interna y la membrana tilacoide) y el espacio tilacoide. Luego veremos que el último de los nombrados equivale, desde el punto de vista funcional, a la matriz mitocondrial.

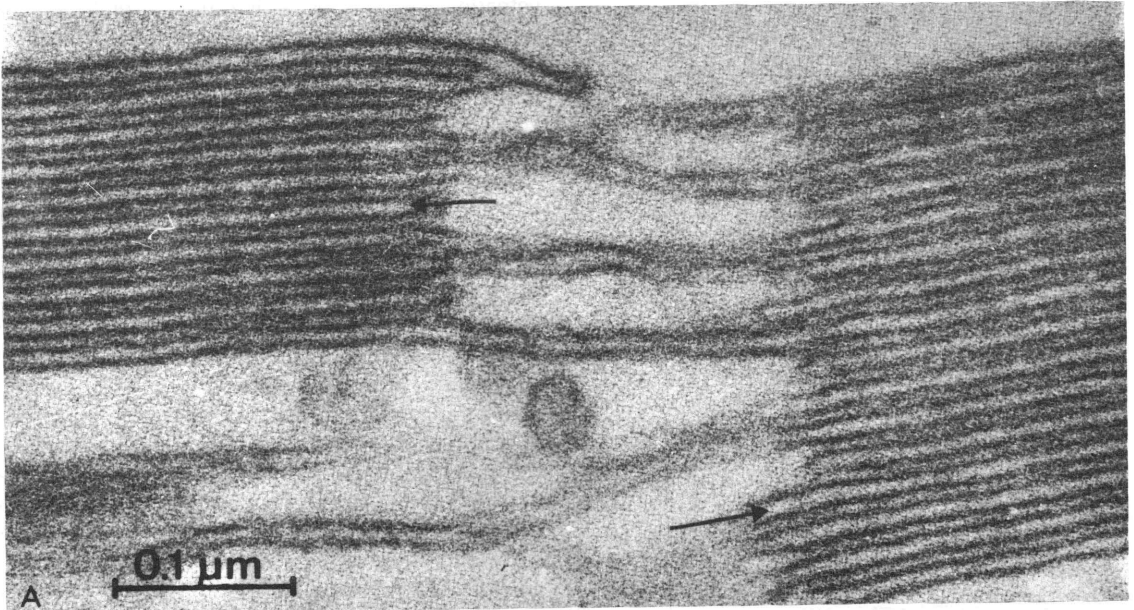


FIG. 19-5. Micrografía electrónica de un cloroplasto que muestra dos grana y los tilacoides de la estroma que los conectan. Las flechas señalan la cavidad del compartimiento membranoso de los grana (es decir, el espacio tilacoide). 240.000x. (Cortesía de I. Nir y D. C. Pease.)

BIOGENESIS DE LOS CLOROPLASTOS

19-13. Los plástidos se desarrollan a partir de proplástidos

Los plástidos se desarrollan a partir de estructuras precursoras llamadas *proplástidos*, que se encuentran en las células vegetales no diferenciadas. Según el tipo celular, los proplástidos se convierten en leucoplastos —carentes de pigmentos— o en cromoplastos, entre los que se encuentran los cloroplastos. El desarrollo de estos últimos se ilustra en la figura 19-7. La primera estructura en aparecer es el citado proplástido, de forma discooidal, con un diámetro de alrededor de 1 μm y una pared formada por dos membranas. En presencia de luz, la membrana interna del proplástido crece y emite vesículas en dirección de la estroma, que luego se transforman en sacos aplanados. Estos son los futu-

ros tilacoides, que en algunas regiones se apilan apretadamente para formar los grana. En el cloroplasto maduro los tilacoides ya no se hallan conectados a la membrana interna, pero los grana quedan unidos entre sí por los tilacoides de la estroma.

Si se coloca una planta en un medio poco iluminado, se produce un fenómeno denominado *etiología*, que hace que las hojas pierdan su color verde y se desorganicen las membranas de los tilacoides, cuyo agregado da lugar a los *cuerpos prolamelares*, en los que esas membranas adquieren una disposición en forma de enrejado. En los bordes de estos cuerpos aparecen adheridas membranas de tilacoides jóvenes, que carecen de actividad fotosintética. El cloroplasto, tras esta conversión de los tilacoides, cambia su nombre por el de *etioplasto*. Una vez que las plantas etioladas son expuestas a la luz, los tilacoides reaparecen y el material prolamelar es utilizado para su organización.

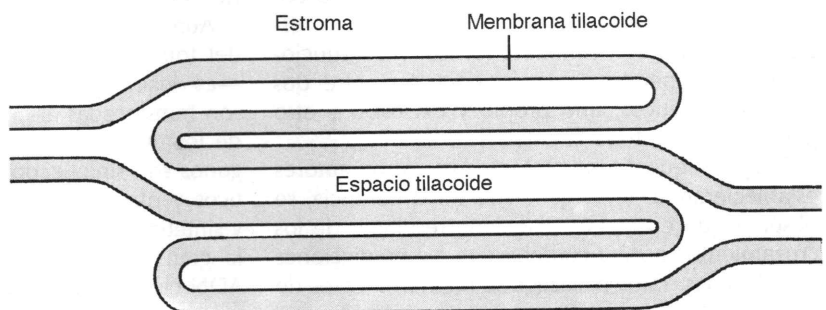


FIG. 19-6. Esquema que ilustra la continuidad del espacio tilacoide y cómo se halla separado de la estroma.

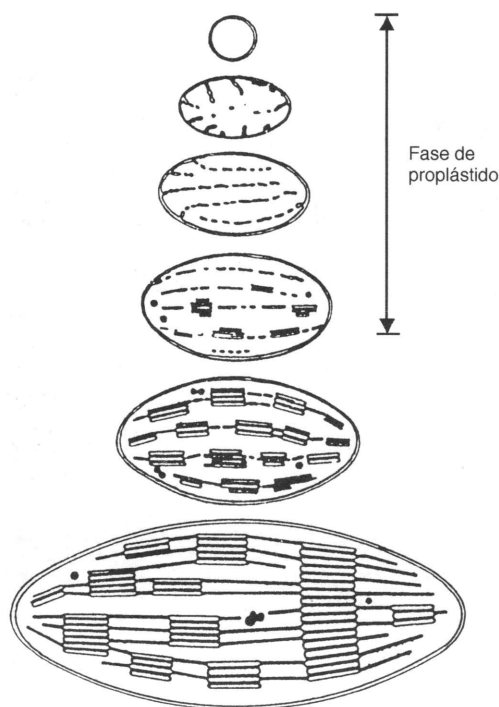


FIG. 19-7. Desarrollo de los plástidos en presencia de luz.

19-14. Los cloroplastos presentan características de organoides semiautónomos

De igual modo que las mitocondrias, tanto los proplástidos como los cloroplastos se multiplican por *fisión*, proceso que exige el crecimiento de proplástidos y cloroplastos preexistentes (cap. 9-23), para lo cual éstos deben crecer previamente hasta duplicar sus tamaños. Como es obvio, ese crecimiento, lo mismo que el experimentado por los proplástidos en vías de convertirse en cloroplastos maduros, requiere que se sinteticen los componentes proteicos normalmente presentes en esos organoides. En tal síntesis intervienen dos sistemas genéticos, el nuclear y uno propio de los cloroplastos.

En efecto, los cloroplastos contienen ADN, ARN y los otros componentes que intervienen en la síntesis de proteínas. Sin embargo, muchas proteínas provienen del citosol, de modo que han sido codificadas por genes nucleares. De tal manera, estos organoides son *semiautónomos* y su funcionamiento depende de la cooperación entre dos sistemas genéticos, uno propio y exclusivo y otro perteneciente a toda la célula.

Después que Mendel, Morgan y otros autores establecieron las leyes generales de la herencia, se observó que en ciertas plantas el resultado de los cruzamientos no concordaba con las predicciones mendelianas. Estos hallazgos se referían a casos de

veteado de hojas —es decir, mutantes en los cuales las hojas presentaban puntos o rayas— por la alteración de cloroplastos pigmentados y no pigmentados. Tal rasgo era heredado exclusivamente por vía materna, es decir, de un modo no mendeliano. Por ejemplo, en una planta masculina veteada cruzada con una femenina de tipo silvestre, todos los descendientes son de tipo silvestre. A la inversa, si la planta femenina es la veteada y la masculina es de tipo silvestre, la progenie es veteada. Este hallazgo sugirió que el veteado se transmite por intermedio del citoplasma materno. Cabe recordar que en el cigoto el espermatozoide contribuye con muy poco citoplasma y con ningún cloroplasto.

Los trabajos realizados posteriormente con otros organismos (levaduras, etc.) demostraron que este comportamiento se debía a genes que se encuentran en el citoplasma, lo cual quedó confirmado con el siguiente experimento: si se hace crecer en la oscuridad al alga unicelular *Euglena*, se ve que contiene pequeños plástidos incoloros. En estas condiciones, la irradiación del núcleo con un haz de rayos ultravioletas —que destruyen los genes nucleares— no interfiere en la formación de los cloroplastos, que aparecen cuando se somete el alga a la luz. Por otro lado, si se protege el núcleo y se irradia el citoplasma, se desarrollan colonias que carecen de cloroplastos (incoloras).

Los cloroplastos contienen un sistema genético definido, basado en un ADN circular de una longitud promedio de 45 μm (posee cerca de 135.000 pares de bases). Se ha conseguido la replicación de este ADN con timidina- ^3H y se realizaron mapas que permitieron la localización topográfica de los genes utilizando enzimas de restricción. Además, se pudo elucidar la secuencia de muchos de esos genes.

Los cloroplastos contienen *ribosomas* pequeños (70S), que representan hasta un 50% de los ribosomas totales de las células fotosintéticas. La síntesis proteica en estos ribosomas es inhibida por concentraciones de *cloranfenicol* que no afectan la síntesis de proteínas en el citoplasma. La participación de las dos síntesis proteicas en el armado de los cloroplastos también puede estudiarse utilizando *ciclohexamida*, que inhibe la síntesis en los ribosomas citoplasmáticos.

Aun cuando parte de las proteínas (casi el 10% del total) se sintetizan en el cloroplasto, el resto —es decir, la mayoría— se elaboran en el citosol y son translocadas al organoide. De los polipéptidos de los tilacoides que actúan en la fotosíntesis, algunos son sintetizados en los ribosomas cloroplásticos y otros son codificados por genes nucleares y sintetizados en ribosomas citosólicos. A pesar de la gran capacidad potencial de codificación del ADN cloroplástico, muchos polipéptidos del cloro-

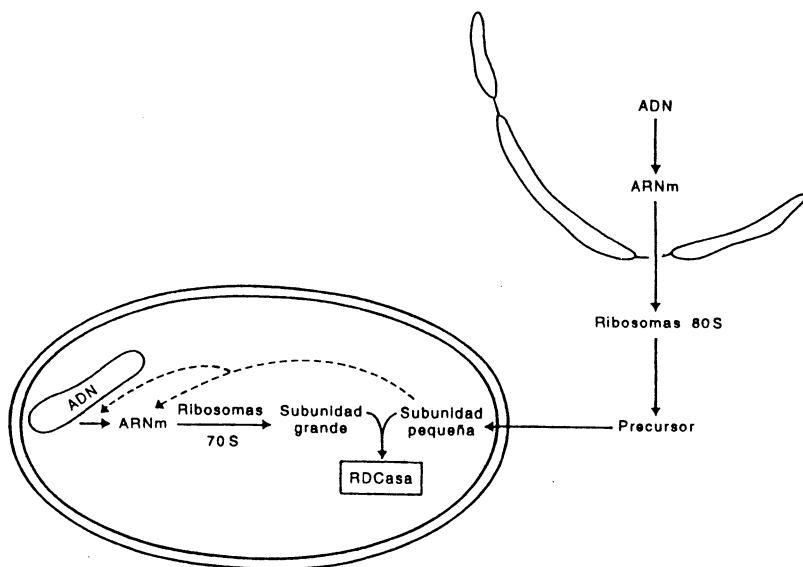


FIG. 19-8. Modelo propuesto para la síntesis de la enzima ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa (RDCasa). (De P. E. Highfield y R. J. Ellis [1978].)

plasto son sintetizados en ribosomas citosólicos. Tal es el caso de las enzimas de la estroma y de la proteína que une la clorofila a la membrana de los tilacoides. Varios polipéptidos estructurales también tienen sus genes localizados en el genoma nuclear.

Una de las enzimas que participa en la elaboración de hidratos de carbono a partir del CO_2 , la *ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa*, representa cerca del 50% de las proteínas solubles totales que se encuentran en los cloroplastos, de modo que podría ser la proteína más abundante de la naturaleza. Comprende dos subunidades, una de alto peso molecular (alrededor de 400 kDa) y otra más pequeña (de unos 100 kDa). La subunidad mayor es codificada por genes que se encuentran en el ADN cloroplástico, mientras que la menor es codificada por genes nucleares. Esta última es sintetizada bajo la forma de un precursor en ribosomas citosólicos libres. Pronto esta molécula precursora ingresa en la estroma del cloroplasto, donde es clivada hasta alcanzar su tamaño definitivo. La envoltura cloroplástica posee receptores que reconocen al péptido señal de las proteínas que deben ser incorporadas al organoide. En el caso de la subunidad menor de la ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa, luego de ingresar en el cloroplasto su péptido señal es separado por una proteasa —que se encuentra en la envoltura del organoide— y la proteína es liberada en la estroma. En la figura 19-8 se resume un modelo de la síntesis de la ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa. El modelo sugiere que la subunidad menor puede controlar la síntesis de la subunidad mayor, con la cual se asociará para formar la enzima activa.

19-15. Los cloroplastos derivarían de una simbiosis

El cloroplasto sería el resultado de una simbiosis entre un microorganismo autótrofo (una bacteria) susceptible de capturar la energía lumínica y una célula huésped heterótrofa (eucariota). Aunque esta hipótesis simbiótica es atractiva, vimos que los cloroplastos tienen en su ADN una información genética que sólo les permite codificar unas pocas proteínas, además de los ARN ribosómicos y de transferencia utilizados en la síntesis de éstas. Por lo tanto, la integración de la mayor parte de los componentes que forman el cloroplasto depende de los genes nucleares y, en consecuencia, de la síntesis de proteínas en el citosol.

FOTOSÍNTESIS

19-16. En la fotosíntesis la energía lumínica se convierte en energía química

La *fotosíntesis* es una de las funciones biológicas fundamentales. Por medio de la clorofila contenida en los cloroplastos, los vegetales verdes son capaces de absorber la energía que la luz solar emite como *fonones* y transformarla en *energía química*. Esta se acumula en las uniones químicas entre los átomos de las moléculas alimenticias formadas a partir del CO_2 atmosférico. En el capítulo 9 se vio cómo transforman y utilizan los animales la energía contenida en las sustancias alimenticias, particularmente mediante la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. La fotosíntesis es, en cierta medida, un

proceso inverso al de la fosforilación oxidativa, de modo que los cloroplastos y las mitocondrias poseen muchas semejanzas estructurales y funcionales.

En la fotosíntesis la principal reacción es:



que consiste en la combinación de CO_2 y H_2O para formar hidratos de carbono con liberación de O_2 .

Se ha calculado que cada molécula de CO_2 de la atmósfera se incorpora a un vegetal cada 200 años, y que el O_2 del aire es renovado por las plantas cada 2.000 años. Sin plantas no existiría O_2 en la atmósfera y la vida sería casi imposible.

Es importante señalar que en la reacción (1) el H_2O es el dador de H_2 (e^- y H^+) y de O_2 . El CO_2 actúa como aceptor de H_2 (e^- y H^+).

Los hidratos de carbono formados por la fotosíntesis son sacáridos solubles, los cuales circulan por los distintos tejidos de la planta o se acumulan como granos de almidón en los cloroplastos o, más frecuentemente, en el interior de los amiloplastos. Además, como corolario de diversas reacciones que involucran a diferentes sistemas enzimáticos, el material surgido de la fotosíntesis puede convertirse —por lo general fuera de los plástidos— en un polisacárido estructural o en lípidos o proteínas de la planta.

19-17. La clorofila es un pigmento capaz de ser excitado por la luz

La luz visible corresponde a una pequeña porción del espectro de radiación electromagnética total y comprende las longitudes de onda de 400 a 700 nm. La energía contenida en estas longitudes es transmitida en unidades denominadas fotones. Un fotón contiene un *cuanto* de energía. Esto se expresa con la ecuación enunciada por Max Planck en el año 1900:

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

donde h es la constante de Planck ($1,585 \times 10^{34}$ cal/seg), c es la velocidad de la luz (3×10^{10} cm/seg) y λ es la longitud de onda de la radiación. Esta ecuación muestra que los fotones con longitudes de onda más corta tienen mayor energía.

Los pigmentos como la *clorofila* están particularmente adaptados para ser excitados por la luz. Así, los fotones absorbidos producen la excitación de electrones en la clorofila, que al desplazarse de la órbita de sus átomos adquieren un nivel de energía mayor, es decir, un elevado potencial de transferencia. Esta energía puede disiparse en forma de calor o radiación (fluorescencia), ser transferida de una molécula a otra por resonancia o convertirse en energía química (los dos últimos procesos se dan en la fotosíntesis).

19-18. La fotosíntesis comprende reacciones fotoquímicas y reacciones que tienen lugar en la oscuridad

La fotosíntesis comprende una serie compleja de reacciones, algunas de las cuales tienen lugar exclusivamente en presencia de luz y otras se producen en la oscuridad (aunque éstas también pueden ocurrir en presencia de luz). Se las llama, respectivamente, *reacciones lumínicas* (o *fotoquímicas*) y *reacciones en la oscuridad*. En las fases finales de las reacciones fotoquímicas se forma NADPH (a partir de NADP^+ , e^- y H^+) y ATP (a partir de ADP y fosfato). Ambos procesos remedian a los que ocurren en las mitocondrias. En la fotosíntesis la formación de ATP lleva el nombre de *foto-fosforilación*.

Debe recordarse que en la fosforilación oxidativa —en las mitocondrias— el flujo de electrones se desplaza desde el NADH (o el FADH_2) hacia el O_2 , con generación de H_2O (cap. 9-15). En la fotosíntesis ocurre el fenómeno opuesto, pues los electrones fluyen desde el H_2O —previamente disociada en O_2 , H^+ y e^- — hacia el NADPH.

Las reacciones en la oscuridad completan el ciclo fotosintético, ya que en su curso la energía contenida en los ATP y los NADPH es aprovechada para elaborar —usando CO_2 tomado de la atmósfera— diversas moléculas alimenticias.

19-19. Existen varias clases de clorofilas

Las reacciones fotoquímicas se producen en la membrana tilacoide, cuya bicapa lipídica contiene una serie de complejos proteicos transmembranosos, algunos asociados a pigmentos. Estos son los encargados de capturar la energía lumínica solar. Existen varios tipos, cada uno con una capacidad de absorción de una gama particular de longitudes de onda del espectro lumínico.

Entre los pigmentos se destacan las *clorofilas*, moléculas asimétricas que contienen una cabeza hidrofílica, integrada por cuatro anillos pirrólicos unidos por un átomo de Mg, y una cola hidrofílica (fitol), ligada a uno de los anillos (fig. 19-9).

Otros pigmentos presentes en la membrana tilacoide son los *carotenoides* (carotenos y xantófilas), que se hallan ocultos por el color verde de la clorofila (fig. 19-9). Cuando ésta disminuye en otoño, se ponen de manifiesto los colores amarillos, anaranjados y rojos de los carotenoides.

Existen dos tipos de clorofila: a y b. En la *clorofila b*, un grupo $-\text{CHO}$ reemplaza a uno $-\text{CH}_3$ de la *clorofila a* (marcado con un círculo en la figura 19-9). Por otra parte, hay varias clases de clorofila a, caracterizadas por sus composiciones químicas, sus espectros de absorción de la luz y sus funciones. Se destacan tres: una clorofila a muy abundante, encargada de captar la energía lumínica, y otras dos

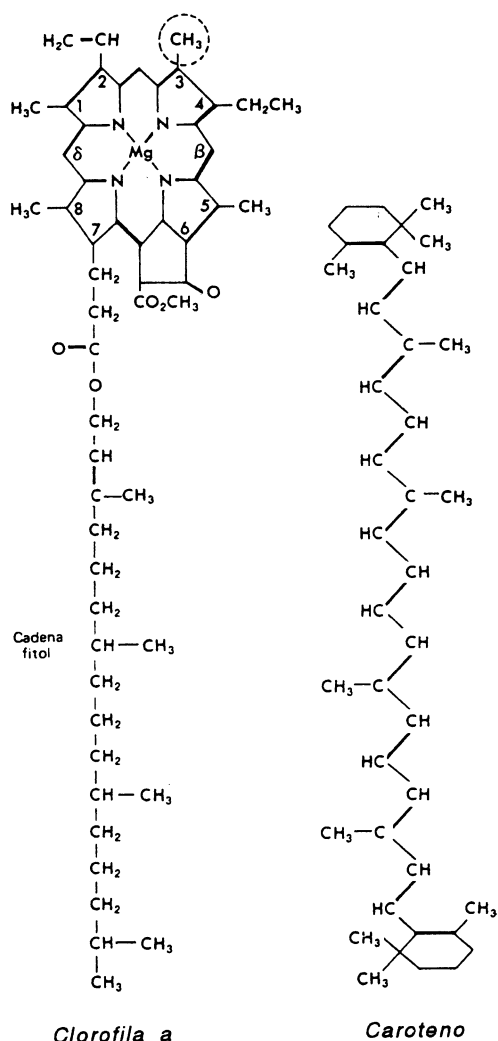


FIG. 19-9. Estructura química de la clorofila a y del β -caroteno.

especiales —menos numerosas—, llamadas P_{680} y P_{700} (P por “pigmento”, mientras que el número identifica la longitud de onda absorbida más eficientemente).

19-20. En la membrana de los tilacoides se encuentran los complejos moleculares responsables de las reacciones fotosintéticas

Así como en la membrana interna de las mitocondrias hay *cadenas transportadoras de electrones* que dan lugar a la fosforilación oxidativa, en la membrana tilacoide de los cloroplastos también existen cadenas de complejos moleculares, aunque aquí son responsables de las reacciones fotoquímicas. Cada una de las cadenas está integrada por los siguientes eslabones, los cuales serán mencionados en el orden en que se activan (fig. 19-10).

Fotosistema II. Es un complejo molecular que posee dos sectores claramente definidos, uno llamado *antena* —se encarga de capturar la luz—, que da hacia la estroma, y otro denominado *centro de reacción*, que da hacia el espacio tilacoide. La *antena* ha sido comparada con un embudo, cuya pared está formada por agregados de proteínas y pigmentos, especialmente de clorofila a, clorofila b y carotenoides. Por su parte, el centro de reacción contiene diversas proteínas asociadas a moléculas de clorofila del tipo P_{680} .

Complejo b-f. Este complejo contiene una proteína de 17 kDa asociada a los citocromos f y b, y una proteína con un centro Fe-S.

Fotosistema I. Es un complejo molecular que, como el fotosistema II, posee una *antena* captadora de energía lumínica, integrada por proteínas, clorofila a, clorofila b y carotenoides, y un *centro de reacción*, compuesto por proteínas y moléculas de clorofila de tipo P_{700} .

NADP reductasa. Este complejo enzimático reduce las moléculas de NADP^+ presentes en la estroma —con H^+ tomados también de ésta— para convertirlas en NADPH.

Como se observa en la figura 19-10, entre estos complejos se encuentran varias moléculas intermedias: 1) la *plastoquinona*, entre el fotosistema II y el complejo b-f (equivale a la ubiquinona de las mitocondrias); 2) una pequeña proteína llamada *plastocianina*, entre el complejo b-f y el fotosistema I, y 3) la *ferredoxina*, entre este fotosistema y la NADP reductasa.

19-21. La ATP sintetasa se localiza en la membrana de los tilacoides

En las inmediaciones de las cadenas responsables de las reacciones fotoquímicas se encuentran *ATP sintetasas*, cada una de las cuales —como en las mitocondrias— posee una porción transmembrana F_0 , por la que pasan los protones, y una porción F_1 , que genera ATP a partir de ADP y fosfato (cap. 9-16). La porción F_1 da hacia la estroma del cloroplasto (fig. 19-10).

19-22. Los fotones excitan a las clorofilas presentes en los fotosistemas II y I

Cuando un fotón excita a una molécula de clorofila, uno de los electrones de la clorofila es sacado de su órbita molecular y transferido a otra de mayor energía. En el caso de las clorofilas situadas en la *antena* del fotosistema II, la energía del electrón energizado es transferida por resonancia a uno de los electrones de la clorofila P_{680} , localizada —como vimos— en el centro de reacción del fotosistema. El nuevo electrón energizado abandona el

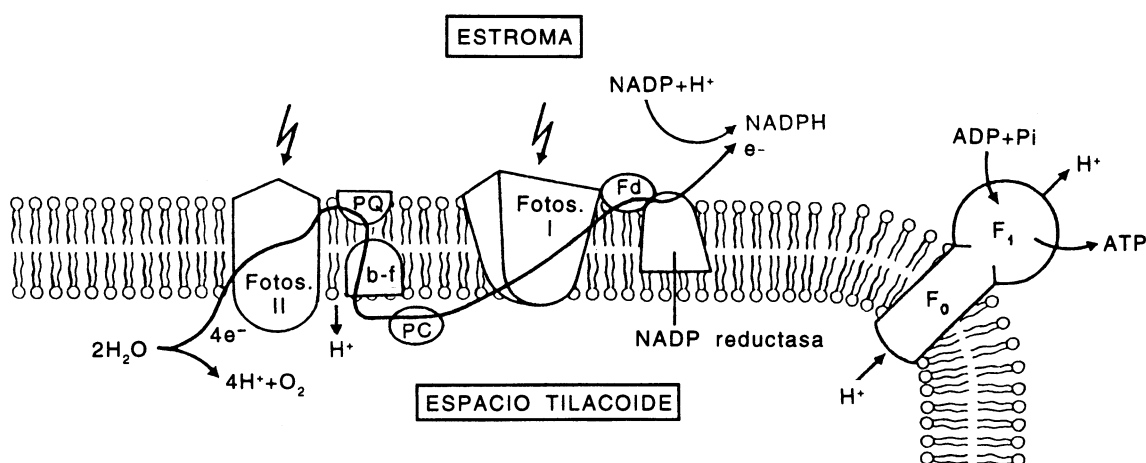


FIG. 19-10. Estructura molecular de la membrana tilacoide. La línea gruesa marca el flujo de electrones a través de la cadena de complejos moleculares. La energía lumínica es captada por el fotosistema II. Se produce la fotólisis del H_2O en el interior del tilacoide y los electrones son transmitidos a la plastoquinona (PQ). De allí pasan al complejo b-f y luego a la plastocianina (PC). Esta los transfiere al fotosistema I, que absorbe luz. Luego los electrones son transportados a la ferredoxina (Fd) y a la NADP reductasa, que reduce el NADP^+ a NADPH. La acumulación de protones (H^+) en el interior del tilacoide crea un gradiente con respecto a la estroma, de modo que salen a través de la ATP sintetasa, que produce ATP. (Cortesía de L. Bogorad, modificado.)

fotosistema II y pasa al siguiente eslabón de la cadena responsable de las reacciones fotoquímicas y es, por ende, aceptado por la *plastoquinona*. Mientras tanto, por una reacción química no muy bien conocida en la que intervienen átomos de manganeso, dos moléculas de H_2O situadas en el espacio tilacoide son escindidas y se generan un O_2 , 4 H^+ y 4 e^- . Cada uno de estos 4 e^- pasa al centro de reacción del fotosistema II y reemplaza al salido de la clorofila P_{680} , transferido, como vimos, a la plastoquinona.

A continuación, el e^- que estaba en la plastoquinona pasa al *complejo b-f*, donde parte de su energía es utilizada para transportar —en contra del gradiente electroquímico— un H^+ desde la estroma al espacio tilacoide (este H^+ se suma a los H^+ generados por la escisión del H_2O). El e^- , con un potencial energético menor, pasa del complejo b-f a la *plastocianina* y de ésta al *fotosistema I*. Antes de analizar su destino, veamos las reacciones acontecidas en el fotosistema I.

Por acción de la luz ocurren procesos equivalentes a los sucedidos en el fotosistema II, con las siguientes particularidades: 1) el e^- energizado en el centro de reacción corresponde a la clorofila P_{700} (no a la P_{680}); 2) este e^- es transferido a la *ferredoxina* (no a la plastoquinona), y 3) es reemplazado por el e^- de bajo potencial energético proveniente de la plastocianina (no de la escisión del H_2O).

El nuevo e^- , considerablemente revitalizado, deja la ferredoxina e ingresa en la *NADP reductasa*, donde parte de su energía es utilizada para reducir un NADP^+ a NADPH en el lado de la membrana

tilacoide que da a la estroma. En este proceso se utiliza un H^+ tomado de la estroma.

El último paso de las reacciones fotoquímicas corresponde a la *fotofosforilación*, es decir, la formación de ATP a partir de ADP y fosfato. Esta tiene lugar en la *ATP sintetasa*, que por su porción F_0 permite el traslado pasivo de los H^+ desde el espacio tilacoide a la estroma. Durante ese pasaje la energía protomotriz contenida en los H^+ es cedida a la porción F_1 de la ATP sintetasa, que la utiliza para la síntesis de ATP (fig. 19-10).

Mediante la fotofosforilación los vegetales verdes pueden producir una cantidad de ATP 30 veces mayor que la obtenida en sus propias mitocondrias. Por otra parte, las células vegetales poseen muchos más cloroplastos que mitocondrias.

Se requieren 8 fotones para liberar 2 moléculas de O_2 (más 8 e^- y 8 H^+) del H_2O . La energía de esos fotones, transferida a los e^- , al alcanzar éstos la NADP reductasa genera 2 NADPH, mientras que el gradiente de H^+ , consecuencia también de la energía cedida por los electrones, posibilita la síntesis de 3 ATP.

19-23. Las reacciones en la oscuridad tienen lugar en la estroma del cloroplasto

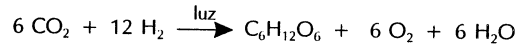
En las reacciones fotosintéticas que tienen lugar en la oscuridad, las moléculas de ATP y NADPH producidas por las reacciones fotoquímicas proporcionan la energía necesaria para sintetizar hidratos de carbono a partir de CO_2 y H_2O . Tal síntesis se produce en la estroma del cloroplasto mediante

una serie de reacciones químicas agrupadas con el nombre de *ciclo de Calvin* o *del C₃*, en las que intervienen varias enzimas localizadas en aquélla.

Como puede verse en la figura 19-11, la reacción inicial por la cual ingresan el CO₂ y el H₂O al ciclo de Calvin es catalizada por la enzima *ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa*. Se trata de una enzima de gran tamaño (500 kDa) que representa casi la mitad de las proteínas de la estroma. Por su acción, en presencia de H₂O, tres pentosas *ribulosa 1,5-difosfato* se combinan con tres moléculas de CO₂ y producen seis moléculas de *3-fosfoglicerato*. Estas triosas pronto son fosforiladas por fosfatos provenientes del ATP, lo cual genera moléculas de tres carbonos capaces de aceptar H⁺ y e⁻ del NADPH, concretamente seis *3-fosfogliceraldehídos*. Uno de éstos abandona el ciclo para convertirse —mediante la acción de enzimas específicas— en hidratos de carbonos más complejos, en ácidos grasos o en aminoácidos. Por su parte, los cinco *3-fosfogliceraldehídos* restantes son reducidos hasta la formación de tres *ribulosa 1,5-difosfato*, con las que podrá desencadenarse un nuevo ciclo de Calvin.

19-24. La fotosíntesis genera hidratos de carbono, agua y oxígeno

El balance químico de la fotosíntesis es el siguiente:



que representa una acumulación de 686.000 calorías por mol. Esta energía es proporcionada por 12 moléculas de NADPH y 18 de ATP, que contienen 750.000 calorías. Así, la eficiencia alcanzada por el ciclo fotosintético llega al 90%.

En resumen, los fotones absorbidos por la clorofila y otros pigmentos primero son convertidos en energía química bajo la forma de ATP y NADPH. Durante esta fase fotoquímica el H₂O pierde su O₂, el cual se libera hacia la atmósfera como un producto secundario. La reducción del CO₂ se produce en la oscuridad (no necesariamente), siempre que haya ATP y NADPH. Los productos de esta fase son hexosas, a partir de las cuales en otros lugares de la célula suelen generarse hidratos de carbono de distinta calidad.

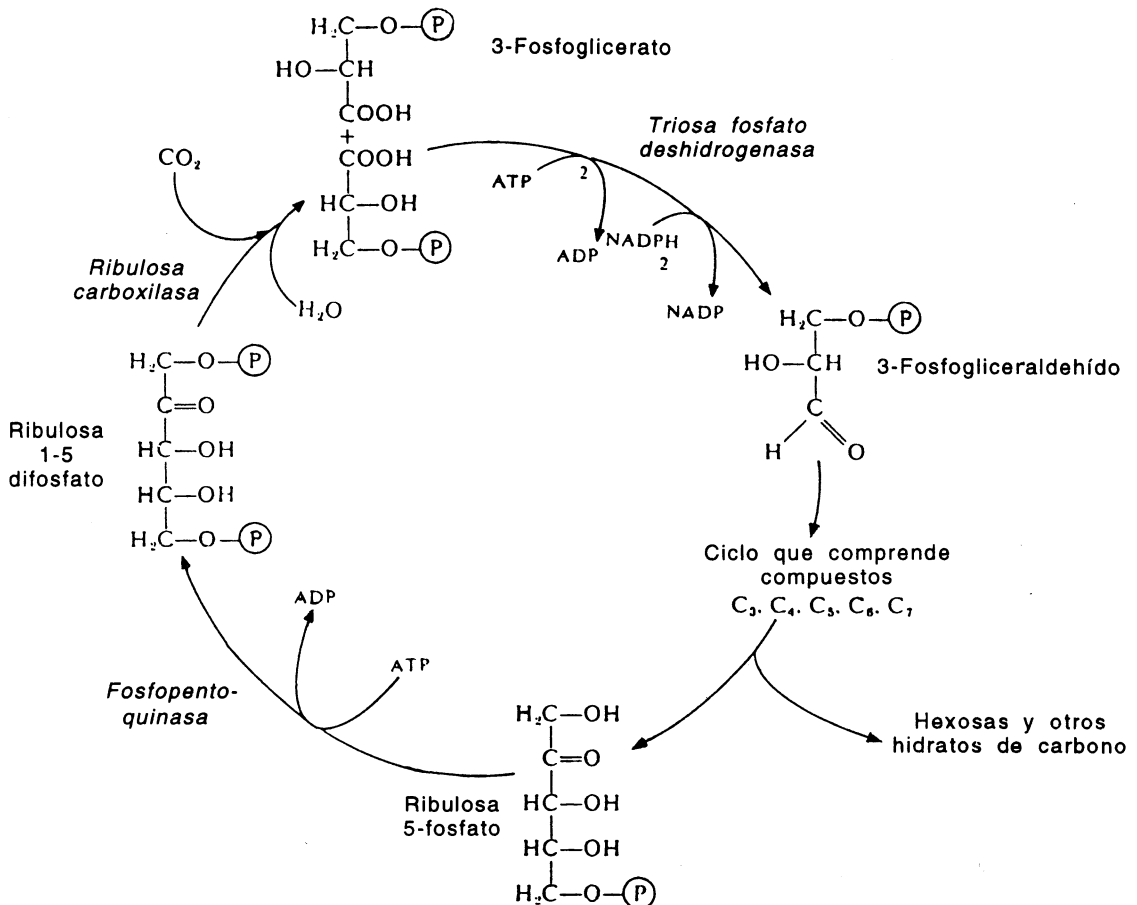


FIG. 19-11. Ciclo de Calvin (o del C₃) de la fotosíntesis, en el que se reduce el CO₂ y se sintetizan hidratos de carbono.

19-25. El ciclo del C_4 tiene lugar en las angiospermas

El ciclo de Calvin se produce en los vegetales superiores, pero se descubrió que en las células de algunos tejidos de las angiospermas el producto inicial del ciclo no es el 3-fosfoglicerato sino el oxalacetato, una molécula de cuatro carbonos. La enzima actuante es la fosfoenolpiruvato deshidrogenasa, y la primera reacción del ciclo consiste en la reducción del CO_2 por el fosfoenolpiruvato.

REPRODUCCION DE LAS PLANTAS Y MULTIPLICACION DE LAS CELULAS VEGETALES

19-26. La división de las células vegetales es parecida a la de las células animales, pero la reproducción de las plantas es muy diferente de la reproducción sexual de los animales

Los mecanismos celulares vinculados con la reproducción de los animales son bastante diferentes de los de las plantas. Los de los animales han sido analizados en el capítulo 16 (16-17 a 16-19), al que el lector deberá remitirse antes de abordar esta sección. Aunque menos profundas, también existen diferencias entre los animales y los vegetales en la división de las células somáticas. Aquí solamente

señalaremos las disimilitudes, ya que la mayoría de los procesos que se registran en la división celular mitótica —analizados en el capítulo 15— son comunes a ambas clases de células.

19-27. Las mitosis en las células vegetales presentan algunas peculiaridades

En los vegetales superiores —como las angiospermas y la mayoría de las gimnospermas—, las mitosis son *anastrales*, es decir, carecen de centriolos y de las fibras del áster (fig. 19-12). Ello es lo que indujo a sospechar que los centriolos no son indispensables para la formación del huso mitótico (cap. 15-6).

Para dar lugar a la citocinesis, la región intermedia del huso mitótico se transforma en el *fragmentoplasto*, que equivale al cuerpo intermedio de las células animales (fig. 19-12). El fragmentoplasto comienza a formarse al promediar la anafase. El microscopio electrónico permite ver que, en el plano ecuatorial de la célula, los microtúbulos de las fibras polares del huso se han asociado a un material denso y a vesículas derivadas del complejo de Golgi. Al principio el fragmentoplasto se dispone como un anillo en la periferia de la célula, pero luego, por el agregado de nuevos microtúbulos y vesículas, crece centrípetamente hasta extenderse por todo el plano ecuatorial. Las vesículas aumentan de tamaño y luego se fusionan entre sí para dar

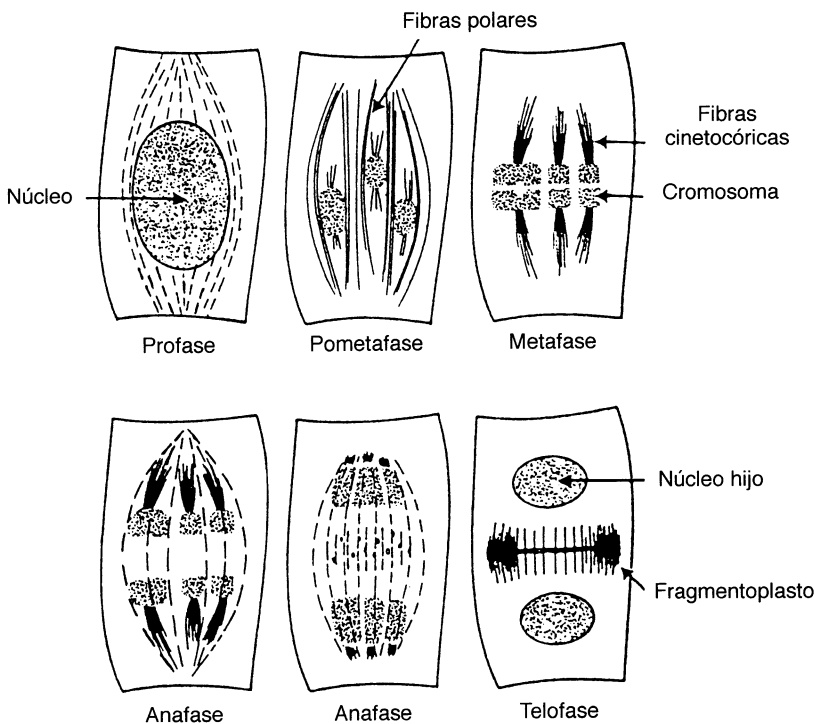


FIG. 19-12. Esquema de la mitosis en la célula vegetal. Obsérvese la falta de centriolos y de fibras del áster. (Cortesía de S. Inoué.)

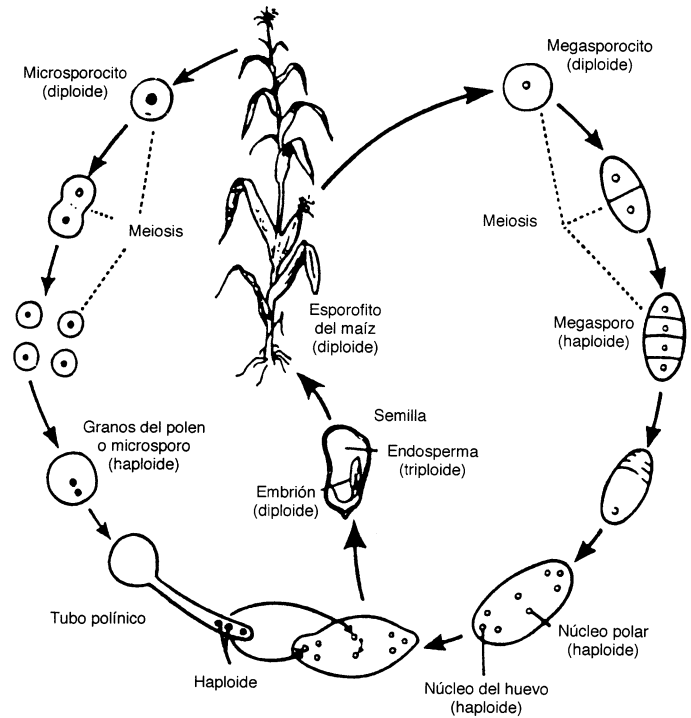


FIG. 19-13. Ciclo vital de una planta fanerógama. (De Sinnot, Dunn y Dobzhansky [1958].)

lugar —en las células hijas— a membranas plasmáticas relativamente continuas, fenómeno que coincide con la transformación del fragmentoplasto en una estructura llamada *placa celular* (sección 19-4). La placa celular es atravesada por pequeñas conexiones citoplasmáticas —los *plasmodesmos*—, por los cuales quedan comunicados los citoplasmas de las células hijas adyacentes (sección 19-6).

La formación de la placa celular conduce a la formación de la *pared celular*. Para ello, las vesículas del fragmentoplasto derivadas del complejo de Golgi, que contienen un material de secreción constituido fundamentalmente por pectina, al fusionarse entre sí colocan a la pectina en el espacio extracelular entre las células hijas. La *pectina* —un polímero amorfo que contiene ácido galacturónico— forma el cuerpo principal de la pared celular primaria. Posteriormente, sobre las superficies enfrentadas de ambas células hijas se depositan las microfibrillas de celulosa, que se disponen como un enrejado semicristalino.

19-28. Los mecanismos celulares vinculados con la reproducción de las plantas son diferentes de los mecanismos que usan los animales

En las plantas superiores la *meiosis* es esporica y, como se observa en la figura 19-13, ocurre en un momento intermedio entre la formación de los

gametos y la fecundación. Además, las primeras células de las líneas germinativas derivan del cigoto y se multiplican por mitosis. Los órganos reproductores masculino (antera) y femenino (ovario o pistilo) generan, respectivamente, *microsporos* y *megasporos*. Las células que experimentan meiosis para constituir megasporos se denominan *megasporocitos*. Los microsporos proceden, a su vez, de *microsporocitos*. Al dividirse por meiosis, cada microsporocito forma cuatro microsporos haploides funcionales, mientras que de cada megasporocito se originan cuatro megasporos haploides, tres de los cuales degeneran. El megasporo restante se convertirá en un gametofito femenino, que al ser fecundado dará lugar a la célula huevo o cigoto. Los microsporos y los megasporos no son las células finales. Antes de la fecundación, los microsporos sufren dos divisiones mitóticas en la antera y los megasporos tres divisiones en el pistilo, que producen, respectivamente, los gametofitos masculinos y femeninos.

En las plantas la fecundación es un fenómeno complejo. Cada grano de *polen* —es decir, el microsporo— lleva dos núcleos. Uno de ellos fecunda al megasporo; se forma así la *célula huevo* o *cigoto* (diploide), de la que se originará el embrión de la nueva planta. El otro núcleo del microsporo se une a dos núcleos polares y constituye un núcleo endospermico (triploide), el cual, por divisiones mitóticas, generará el *endosperma*, que contiene el ma-

terial nutricio del embrión. Como vemos, la semilla es un mosaico de tejidos, en el que el embrión es diploide, el endosperma es triploide y los tegumentos son diploides de origen materno.

BIBLIOGRAFIA

- Albersheim P. (1975) The walls of growing plant cells. *Sci. Am.* 232:80.
- Anderson J. M. (1982) The role of chlorophyll-protein complexes in the function and structure of chloroplasts thylakoids. *Mol. Cell. Biochem.* 46:161.
- Anderson J. M. (1986) Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:93.
- Anderson J. M. and Anderson B. (1982) The architecture of photosynthetic membranes. *Trends Biochem. Sci.* 7:288.
- Armond P. A. and Arntzen C. J. (1977) Localization and characterization of photosystem II in grana and stroma lamellae. *Plant Physiol.* 59:398.
- Avron M. (1977) Energy transduction in chloroplasts. *Annu. Rev. Biochem.* 46:143.
- Avron M. (1978) Energy transduction in photophosphorylation. *FEBS Letter* 96:223.
- Barber J. (1976) *The Intact Chloroplast*. Elsevier Publishing, Amsterdam.
- Barber J. (1976) Cation control in photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 1:33.
- Barber J. (1987) Photosynthetic reaction centers: a common link. *TIBS* 12:321.
- Bjorkman O. and Berry J. (1973) High-efficiency photosynthesis. *Sci. Am.* 229 (4):80.
- Bogorad L. (1981) Chloroplasts. *J. Cell Biol.* 91 N3 Pt 2:256s.
- Brown R. M. Jr. (1979) Biogenesis of natural polymer systems with special reference to cellulose assembly and deposition. In: *Structure and Biochemistry of Natural Biological Systems*. Philip Morris Inc., New York.
- Brown R. M. (1982) *Cellulose and Other Natural Polymer Systems*. Plenum Press, New York.
- Brown R. M. Jr. and Romanovic D. K. (1976) Biogenesis and structure of Golgi-derived cellulosic scales in *Pleuroghrysis*. *Appl. Polym. Symp.* 28:537.
- Carde J. P. (1984) Leucoplasts: a distinct kind of organelles lacking typical 70S ribosomes and free thylakoids. *Eur. J. Cell Biol.* 34:18.
- Chad I. (1977) Ontogeny and assembly of chloroplast membrane polypeptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Cell Biology*. The Rockefeller University Press, New York.
- Cramer W. A., Widger W. R., Hermann R. G. and Trebst A. (1985) Topography and function of thylakoid membrane proteins. *TIBS* 10:125.
- Crease L. L. (ed.) (1982) *Cellular and Subcellular Localization in Plant Metabolism*. Plenum Press, New York.
- Douce R. and Joyard J. (1977) Le chloroplaste. *La Recherche* 8:527.
- Ellis R. J. (1981) Chloroplast proteins: synthesis, transport and assembly. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32:111.
- Govindjee E. (1982) Photosynthesis. Energy Conversion by Plants and Bacteria. Academic Press, New York.
- Hatch M. D. (1977) C₄ pathway photosynthesis: Mechanism and physiological function. *Trends Biochem. Sci.* 2:199.
- Joliot P. (1978) Photosynthèse. *La Recherche* 9:331.
- Juniper B. E. (1977) Some feature of secretory systems in plants. *Histochem. J.* 9:659.
- Kirk J. T. O. and Tilney-Basset R. A. E. (1978) *The plastids: Their chemistry, structure, growth and inheritance*. Elsevier North-Holland Publishing, Amsterdam.
- Knaff D. B. (1989) Structure and regulation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *TIBS* 14:159.
- Krauss N. et al. (1993) Three-dimensional structure of system I of photosynthesis at Å resolution. *Nature* 361:326.
- Ledbetter M. C. and Porter K. R. (1970) *Introduction to the Fine Structure of Plant Cells*. Springer-Verlag, New York.
- Loewus F. (1973) *Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides*. Academic Press, New York.
- Marchant H. J. (1979) Microtubules, cell wall deposition and determination of plant cell shape. *Nature* 278:167.
- Nieden V. et al. (1984) Dictyosomes participate in the intracellular pathway of storage proteins in developing *Vicia faba* cotyledons. *Eur. J. Cell. Biol.* 34:9.
- Northcote D. H. (1974) Differentiation in higher plants. *Oxford Biology Readers* Nº 44.
- Osumi M. et al. (1984) Three-dimensional observation of the prolamellar bodies in etioplasts of squash. *Scanning Electron Microscopy* 1:111.
- Preston R. D. (1974) *The Physical Biology of Plant Cell Walls*. Chapman & Hall, London.
- Robards A. W. (ed.) (1974) *Dynamic Aspects of Plant Ultrastructure*. McGraw-Hill, New York.
- Staehelin L. A. and De Wit M. (1984) Correlation of structure and function of chloroplast membranes at the supra-molecular level. *J. Cell. Biochem.* 24:261.
- Stryer L. (1988) *Biochemistry*, 3rd Ed. W. H. Freeman, New York.
- von Wettstein D. (1981) Chloroplast and nucleus. *Int. Cell. Biol.* Springer-Verlag, Berlin.
- Willison J. H. M. and Brown R. M. Jr. (1978) Cell wall structure and deposition in *Glaucozystis*. *J. Cell Biol.* 77:103.
- Youvan D. and Marrs B. L. (1987) Molecular mechanisms of photosynthesis. *Sci. Am.* 256:42.

Índice alfabético

- Aberraciones cromosómicas, 366, 418
 - en la especie humana, 420
 - estructurales, 418
 - numéricas, 406, 418
- Abl, 387
- Acetilcoenzima A, 277
- Acetilcolina
 - receptor, 208
 - síntesis y metabolismo, 202
- Acetilcolinesterasa, en la sinapsis, 196
- Ácido(s)
 - desoxirribonucleico. V. ADN
 - glucólico, 448
 - grasos, 30, 279
 - nucleicos, 21, 23-28. V. tb. ADN y ARN
 - detección, 63
 - ribonucleico. V. ARN
 - siálico, 29, 32
- Aconitasa, 351
- Acoplamiento
 - en las células cancerosas, 169
 - eléctrico, 167
 - excitación-contracción, 147-150
 - metabólico, 168
- Acrosina, 407, 410
- ACTH, 353
- Actina, 127, 142, 383
- Actina-tropomiosina, 94
- α -Actinina, 130, 143
- Activina, como molécula inductora, 434
- Actomiosina, 145
- Adaptación homeoviscosa, 92
- Adenilato ciclasa, vía, 187
- Adenina, 23
- S-Adenosilmetionina, 326
- ADN, 23, 25
 - análisis molecular, 71-80
 - circular, 452
 - de los cloroplastos, 452
 - desnaturalización, 27
 - doble hélice, 25
 - estructura, 25
 - hibridación, 27
 - metilación, 324
 - método de transferencia, 76
 - de las mitocondrias, 287
 - mutación, 366
 - recombinante, técnica, 73
 - renaturalización, 27
 - reparación, 368
 - repetitivo, 298
 - replicación, 355-366
 - mutaciones espontáneas, 366
 - orígenes, 358
 - unidades, 357
 - satélite, 298
 - secuenciamiento, 71
 - sondas, 75, 76
 - superenrollado, 27
 - superhelicoidal, 27
 - transcripción, 315-340
 - transferencia, 76
 - transposición de secuencias, 369
- ADN glicosilasa, 368
- ADN ligasa, 361, 368
- ADN polimerasas, 356, 361
- Agua celular, 22
 - libre, 22
 - ligada, 22
- Alelos, 415
- Aleurona, granos, 447
- Alimentos, degradación enzimática, 276
- Alu, familia, ADN repetitivo, 298, 358, 370
- α -Amanitina, 317
- Ameboidismo, 132
- Amiloplastos, 449
- Aminoácidos, 33, 279, 286
 - ácidos, 33
 - básicos, 33
 - neutros no polares, 33
 - neutros polares, 33
- Aminoacil-ARNt sintetetasas, 344
- AMP cíclico, 187
 - mediación en respuestas celulares, 187
- Anáfase, 377, 380
- Análisis molecular del ADN, 71-80
- Ancrina, 130
- Aneuploidía, 418
- Anfimixis, 412
- Angelman, síndrome, 325
- Anillo contráctil, en la mitosis, 382
- Aniones superóxido, 291
- Anticodón, 341, 344
- Anticuerpos, 438
 - monoclonales, 441
- Antígenos, 438
- Antiporte, 97
- AP endonucleasa, 368
- Aparatos
 - ciliar, 118-126
 - de Golgi, 239-248
- Apareamiento de los cromosomas, 393
- Apoptosis, 442
- Apurinización, 367
- Arco reflejo, 191
- ARN, 23
 - cortes y empalmes, 327, 329
 - heterogéneo nuclear, 318
 - mensajero, 28, 227, 308, 317
 - policistrónico, 335
 - procesamiento, 325-330
 - regulación del procesamiento, 329
 - regulación de la traducción, 350
 - síntesis, 317
 - supervivencia, 351
 - traducción, 342-354
 - pequeños, 308
 - procesamiento, 317
 - ribosómico, 28, 308, 311
 - 45S, 311, 330
 - 5S, 312, 333
 - procesamiento, 331, 333
 - soluble citoplasmático, 222
 - tipos, 28
 - traducción, 23, 308
 - de transferencia, 28, 227, 308, 313, 334, 341
 - iniciador, 344
- ARN polimerasa, 315, 316, 317, 335
 - I, 317, 330
 - II, 317, 318, 319
 - III, 317, 333, 334

- ARN primasa, 360
 Aro proteico deslizante, 361. V. PCNA
 ARS, 358
 Asimetría de las proteínas, 87
 Aster, 376, 379
 ATP, 274, 283, 284, 285
 ATPasas
 de membrana, 100
 microtubulares asociadas, 113
 de resistencia a multidroga, 100
 ATP sintetasa, 280, 284
 en las células vegetales, 455, 456
 Autoensamblaje de las proteínas, 42
 Autofagosoma, 259
 Autosellado celular, 91
 Autótrofos, organismos, 6
 Axonema, 17, 119
- B-ADN, 27
 Bacteriófagos, 8, 74
 Banda(s)
 A, 137
 de adhesión, 163
 G, 365
 I, 137
 Q, 365
 R, 365
 de sellado, 159
 Bandeado cromosómico, 303
 Barr, cuerpo, 301
 Barrera
 hematobiliar, 160
 hematoencefálica, 160
 hematoocular, 160
 hematotesticular, 160
 hematotímica, 160
 Basofilia, 64
 Bcl, proteína, 443
 Biblioteca de genes, 75
 Biología celular
 desarrollo, 4
 historia, 3
 métodos de estudio, 45-80
 Bivalente, 399
 Blastocisto, 430
 Blastoporo, 431
 Bloqueo de la polispermia, 411
 BMP, proteína, 434
 Bomba
 de calcio, 100
 de protones, 100
 de sodio-potasio, 100
 Burbuja de replicación, 358
- CAAT, caja, 310
 Cadena transportadora de electrones,
 236, 278, 455
 Cadherinas, 162, 175
 Caja homeótica, 437
 Calcio, almacenamiento y liberación,
 238, 286
 Calcitonina, 330
 Callosa, 447
 Calmodulina, 189
- papel en la transmisión sináptica,
 207
 Calvin, ciclo, 457
 Cámbium, 445
 Canales
 de calcio, en el potencial de ac-
 ción, 217
 iónicos, 98
 ligados a receptores, 218
 de potasio, en el potencial de ac-
 ción, 217
 regulados, 98
 mecánicamente, 99
 por ligando, 99
 por voltaje, 98
 de sodio, en el potencial de ac-
 ción, 216
 CAP, 337
 cap, 317, 325, 343
 Capacitación del espermatozoide, 407
 Cápside, 8
 Capsómeros, 8
 Capuchón, 92, 317, 325
 Cardiolipina, 31, 280
 Carioplastos, 428
 Cariotipo, 301
 humano, 303
 Carotenoides, 454
 Carriers, 99
 Cascada de quinasas, 190
 Caseína, 351
 Catalasa, en los peroxisomas, 290
 Cateninas, 130
 CBR, 343
 cdc2, 384, 385
 cdk2, 384
 Cebador, en la replicación del ADN,
 360
 Ced-3, 443
 Ced-4, 443
 Ced-9, 443
 Célula(s), 1-20
 ácidos grasos, 30
 ácidos nucleicos, 23-28
 blanco, de las hormonas, 184
 cancerosas
 control del crecimiento, 177
 y fibronectina, 177
 y transporte de hierro, 177
 características generales, 5-20
 competentes, 433
 componentes químicos, 21-44
 control del ciclo, 383-389
 diferenciación, 426-441
 diploides, 298
 disacáridos, 29
 enzimas, 38-41
 eucariotas, 5, 44
 morfología, 11
 organización general, 9-20
 tamaño, 11
 fosfolípidos, 31
 germinativas primitivas, 406
 glicosaminoglicanos, 30
 haploides, 298
 HeLa, 427
- hidratos de carbono, 28-30
 lípidos, 30-33
 métodos de estudio, 45-80
 monosacáridos, 28
 muscular
 estriada, 136-143
 lisa, 141
 neurosensoriales, del aparato vesti-
 bular, 126
 niveles de organización, 2
 olfatorias, 125
 oligosacáridos, 29
 origen, 41-44
 polisacáridos, 29
 procariotas, 5, 44
 organización general, 6-9
 regulación de la actividad géni-
 ca, 335-340
 proteínas, 32
 secreción, 248
 significado evolutivo, 435
 superficie, 155-180
 totipotentes, 421
 triglicéridos, 30
 vegetal, 445-460
 mitosis, 458
 multiplicación, 458
 pared, 445
 Celulosa, 445
 Cenp, proteínas, 379
 Centrifugación
 diferencial, 69
 isopícnica, 71
 zonal, 71
 Centríolos, 17, 116, 376
 Centro(s)
 celular, 116
 organizadores de microtúbulos,
 110
 Centrómeros, 297, 302, 375, 378
 Centrosomas, 111, 116, 376
 Cerebrósidos, 32
 CGRP, 330
 Chapa estriada, 157
 Chaperonas, 288, 296, 350
 Chédiak-Higashi, síndrome, 113
 Ciclinas, en el control de las divisiones
 celulares, 383
 Ciclo(s)
 del ácido cítrico, 282
 del C₃, 457
 del C₄, 458
 de Calvin, 457
 celular, 13, 355, 373
 control, 383-389
 del glioxilato, 448
 de Krebs, 278, 283
 Ciclohexamida, 452
 Cigoma, 393
 Cigoto, 390
 monosómico, 419
 trisómico, 419
 Cilio(s), 17, 118
 diplosómicos, 125
 movimientos, 121
 primitivo, 125

- Cinetocoros, 375, 378, 399
- Cinetosomas, 111, 118, 121
- Cirros, 118
- Cisternas del aparato de Golgi, 241
- Citocinesis, 378, 381
- Citocromo c, 280
- Citocromo oxidasa, 280
- Citocromo reductasa, 236
- Citoespectrofotometría, 64
- Citoesqueleto, 17, 103-154
- Citogenética, 415-425
- Citolisosoma, 259
- Citometría de flujo, 57
- Citoplasma
 - estructura, 16-20
 - inclusiones, 104
 - pigmentos, 106
- Citoplastos, 428
- Citoqueratina, en los filamentos intermedios, 151
- Citoquímica, 62-68
- Citosina, 23
- Citosol, 16, 104
- Clatrina, en las vesículas sinápticas, 201
- Clivaje celular, 429
- Cloranfenicol, 350, 452
- Clorofila, 454
- Cloroplastos, 20, 448-453
 - biogénesis, 451
 - características, 449
 - envoltura, 449
 - estroma, 449
 - tilacoides, 449
- Coacervados, 43
- Codificador, en los genes, 310, 311
- Código genético, 24, 309, 341
 - en el ADN mitocondrial, 287
 - degeneración, 341
- Codominancia, 416
- Codón(es), 309, 341
 - AUG, 346
 - de iniciación, 342
 - sinónimos, 310
 - de terminación, 310, 344, 347
- Coenzima A (CoA), 277
- Coenzimas, 39
- Cofactores enzimáticos, 39
- Colágeno, 170
- Colesterol, 33, 85
- Coloración, 60
- Compartimiento(s)
 - de los dictiosomas, 247
 - secuestrador de calcio, 189, 238
- Complejo(s),
 - b-f, en las células vegetales, 455
 - de enzima-sustrato, 40
 - de Golgi. V. Aparato de Golgi
 - del poro, en el núcleo celular, 295
 - sinaptonémico, 393
 - de unión, 94, 158
- Complemento, 440
- Comunicación neural, 190-220
- Conducción nerviosa, saltatoria, 216
- Conductos hidrofílicos, 98
- Conexiones radiales, 121
- Conexón, 166
- Congelación-desección, 58
- Congelación-sustitución, 58
- Constricciones secundarias de los cromosomas, 303, 312
- Constante de Michaelis, 40
- Contactos focales, 128, 173
- Contracción
 - muscular, 140, 144
 - acoplamiento excitación-contracción, 147
 - fenómenos energéticos, 146
 - regulación, 146
 - no sarcomérica, 134
- Cooperación metabólica intercelular, 168
- Cortes histológicos, 59
- Cremallera de leucina, 322
- CREST, autoanticuerpos, 379
- Crestas mitocondriales, 280
- Crinofagia, 262
- Crióstato, 59
- Cromátidas, 302, 375
- Cromatina, 297
 - enrollamiento, 323
 - eucromática, 300
 - heterocromática, 300
- Cromoplastos, 20, 449
- Cromosoma(s), 14, 296-306
 - aberraciones, 366, 418
 - acrocéntricos, 303
 - apareamiento, 393
 - bivalentes, 399
 - en las células humanas somáticas, 298
 - en cepillo, 399
 - constricciones secundarias, 312
 - Filadelfia, 424
 - hijos, 377
 - homólogos, 390
 - metacéntricos, 303
 - papel en la evolución, 424
 - plumulados, 399
 - submetacéntricos, 303
 - técnicas de bandedo, 304
- Crossing-over, 397
- Cubierta celular, 12, 88
- Cuerpo(s)
 - de Barr, 301, 324
 - basales, 17, 118, 121
 - intermedio, 378, 381
 - prolamelares, 451
 - proteicos, 447
- Cultivos de tejidos, 55-57
 - de líneas celulares establecidas, 57
 - primarios, 56
 - secundarios, 56
- Cúpula geodésica, 129
- Dale, regla, 204
- Dedos de cinc, 322
- Deleción, 366, 419
- Densidad de flotación, 71
- Denudación, 410
- Desaminación, 367, 368
- Descarboxilación oxidativa, 277, 281
- Desmina, en las células musculares, 152
- Desmocalcina, 163
- Desmocolinas, 163
- Desmoglea, 162
- Desmogleínas, 163
- Desmoiquina, 163
- Desmoplaquinas, 163
- Desmosoma(s)
 - en banda, 158, 163
 - en cinturón, 158, 163
 - puntiforme, 162
- Desnaturalización del ADN, 27
- Desoxirribosa, 23
- Desplazamiento celular, función de los microfilamentos, 132
- Determinación, 434
- Determinantes citoplasmáticos, 429
- Diacilglicerol, 409
- Dictiosomas, 241
 - compartimientos, 247
- Diferenciación celular, 426-437
- Difosfatidilglicerol, 31, 280
- Difusión
 - facilitada, 97
 - simple, 97
- Dímeros de timina, 367, 369
- Dinamina, 114
- Dineína(s)
 - brazos, 121
 - ciliar, 114
 - citoplasmáticas, 114
- Diploides, células, 298
- Diplonema, 399
- Diplosomas, 116
- Disacáridos, 28
- Disco(s)
 - H, 137
 - imaginales, 436
 - Z, 137, 139
- Disomía uniparental, 325
- Distrofina, 143
 - en las células musculares, 96
- Dolicol, 33
- Dominio
 - apical o superficial, 161
 - basal o lateral, 161
- Domo geodésico, 129
- Dorsalina, 434
- Down, síndrome, 421
- Duplicación cromosómica, 419
- Edwards, síndrome, 421
- EF1 α , 347
- EF2, 347
- Electroforesis, 38, 76
- Electrones, potencial de transferencia, 283
- Elongación, factores, 318
- Elonginas, 318
- Encaje, inducido, 39
- Endocitosis, 263-267
- Endomembranas, 17, 222-273
- Endonucleasas de restricción, 73, 77
- Endosomas, 19, 271

- Endosperma, 459
- Enlaces
 N-glicosídicos, 29
 O-glicosídicos, 29
- Enrollamiento de la cromatina, 323
- Entactina-nidógeno, 173
- Envoltura nuclear, 14, 17, 294, 295, 381
- Enzimas, 38-41
 comportamiento cinético, 40
 en la degradación de alimentos, 276
 detección, 65
 especificidad, 39
 inhibición
 irreversible, 40
 reversible, 40
 oxidativas, 290
- erb-A, 387
- Ergastoplasma, 223
- Eritromicina, 350
- Eritropoyetina, 386
- Esclerodermia, 379
- Esfingofosfolípidos, 31
- Espaciadores, 317
- Espacio
 perinuclear, 295
 periplasmático, 6
 tilacoide, 450
- Espectrina, 94, 130
- Espermatogonios, 391
- Espermatozoide, 407
- Espinas dendríticas, 198
- Espliceosoma, 327
- Esqueleto de membrana, 94, 131
- Esterasas, detección, 65
- Estereocilios, 157
- Esteroides, 32
 síntesis
 en el retículo endoplasmático liso, 235
 en las mitocondrias, 286
- Estreptomina, 350
- Estroma de los cloroplastos, 449
- Estructuras diméricas simétricas, 321
 tipo cremallera de leucina, 322
 tipo dedos de cinc, 322
 tipo hélice-bucle-hélice, 323
 tipo hélice-vuelta-hélice, 322
- Etiolación, 451
- Etioplasto, 451
- Eucariotas, 5, 9, 44
- Eucromatina, 14, 300, 323, 365
- Exocitosis, 252
- Exones, 308, 327, 329
- Explosión metabólica, 264
- Extremo
 más, 111, 129
 menos, 111, 129
 proximal del centríolo, 116
- Factor(es)
 de agregación, 174
 antimülleriano, 186
- de crecimiento, 351, 385, 387
- del endotelio vascular, 386
- epidérmico, 186, 385
- fibroblástico, 385, 434
- de los hepatocitos, 386
- plaquetario, 385
- TGF- β , 434
- de elongación, 318
 en la síntesis proteica, 347
- hemopoyéticos, 386
- de iniciación, en la síntesis proteica, 346
- promotor de la mitosis, 384
- promotor de la replicación, 384
- de relajación, derivado del endotelio, 183
- de terminación, 347
- de transcripción, 317, 318, 320
 activadores, 317
 basales, 317
 constitutivos, 319
 específicos, 317, 429, 437
 facultativos, 319
- FAD, 276, 279, 284, 285
- FADH₂, 276, 279, 284, 285
- Fagocitosis, 264
- Fecundación, 407-413
- Fenómeno del capuchón, 92
- Fenotipo, 415
- Ferredoxina, en las células vegetales, 455
- Ferritina, 351
- Fes, 387
- Feulgen, reacción, 63
- Fibras
 del áster, 379
 cinetocóricas, 376
 nerviosas
 amielínicas, 214
 mielínicas, 214
 organización general, 214-220
 propiedades, 214
 polares, 376
 de tensión, 173
- Fibrillas ancladoras, 173
- Fibronectina(s), 171
 y células cancerosas, 177
- Fijación del material histológico, 58
- Filadelfia, cromosoma, 424
- Filamentos
 de actina, 17, 383
 de actomiosina, 17
 intermedios, 17, 150, 163
- Filamina, 130
- Filopodios, 132
- Fimbrina, 130
- Flagelos, 118
- Flavina adenina dinucleótido, en las reacciones de oxidación y reducción, 276
- Floema, 445
- Fluidez de las membranas, 91
- Flujo axónico rápido, 115
 anterógrado o centrífugo, 115
 retrógrado o centrípeto, 115
- Fluorescencia, recuperación luego del fotoblanqueo, 93
- Fosfatasas
 detección, 65
 de proteínas, 188
- Fosfoinositol difosfato, 409
- Fosfolipasa
 C, 187
 C- β , vía, 189
- Fosfolípidos, 31
 de la membrana celular, 84
- Fosforilación oxidativa, 278, 283
 diferencias con la fotosíntesis, 275
- Fotofosforilación, 456
- Fotorreceptores, 124
- Fotorrespiración, 448
- Fotosíntesis, 453-458
 diferencias con la fosforilación oxidativa, 275
 reacciones
 lumínicas, 454
 en la oscuridad, 456
- Fotosistemas, 455
- Fracción, microsómica, 223, 234
- Fraccionamiento celular, 69-71
 centrifugación diferencial, 71
- Fragmentoplasto, 458
- Fragmento(s)
 de Okazaki, 360, 361
 de restricción, 75
- Fusión
 celular, 92, 427, 440
 del ovocito y el espermatozoide, 411
- Gametos, 390
- Gangliósidos, 32
- Gap junctions, 165
- Gelsolina, 130
- Genes
 biblioteca de, 75
 de la cadena liviana, 439
 de la cadena pesada, 438
 clonación, 74
 composición, 310
 control de la actividad, 318
 en procariontes, 335
 dominantes, 415
 estructura, 307-314
 de hendidura, 437
 homeóticos, 437
 de mantenimiento, 437
 de la polaridad
 de la célula huevo, 436
 de los segmentos, 437
 de regla par, 437
 recesivos, 415
 rectores, 429
 segmentarios, 437
 supresores de tumores, 386, 387, 443
- Genoma, 297
- Genoteca, 75
- Genotipo, 415
- Girasa, 364

- Glicerofosfolípidos, 31
- Glicerol 3-fosfato, 285
- Glicolípidos, 29, 32
- Glicoproteínas, 29
- Glicosaminoglicanos, 30, 170
- Glioxilato, ciclo, 448
- Glioxisomas, 447
- β -Globina, 351, 370
- Glucocáliz, 89
- Glucógeno, 105, 277
- Glucogenólisis, 105, 237
- Glucólisis, 277
- Glucoproteína P (P-170), en las membranas plasmáticas, 100
- Glucosaminoglucanos, 30, 170
- Glucosiltransferasas, en el aparato de Golgi, 246, 446
- Glucosomas, 105
- Glucuroniltransferasas, 236
- Golgi. V. Aparato de Golgi
- Gradientes
 - de concentración de H^+ , 284
 - electroquímico, 284
 - de pH, 284
- Grana, 449
- Granos de aleurona, 447
- Gránulos de zimógeno, 249
- Grasa parda, 286
- Guanilato ciclasa, 182, 192
- Guanina, 23

- Haploides, células, 298
- Helicasa, 363, 369
- Hélice α , 35
- Hélice-bucle-hélice, 323
- Hélice-vuelta-hélice, 322
- Hemicelulosa, 446
- Hemidesmosomas, 173
- Hepatitis B, 387
- Herencia mendeliana, leyes, 414
- Heterocarión, 427
- Heterocigotos, 415
- Heterocromatina, 14, 300, 323, 365
 - constitutiva, 301
 - facultativa, 301
- Heterofagosoma, 259
- Heterótrofos, organismos, 6
- Hialuronidasa, 407, 408, 410
- Hibridación
 - in situ*, 79
 - molecular, 27
- Hidratos de carbono
 - celulares, 28-30
 - detección, 62
 - de la membrana celular, 88
- Hidrolasas ácidas, detección, 66
- Hiperactivación del espermatozoide, 407, 408, 410
- Hipótesis vesicular de la transmisión sináptica, 205
- Histonas, 14, 327, 351
 - y cromatina, 298
 - genes, 311
 - síntesis, 365
- Histoquímica, 62-68

- Hoja
 - centriolar, 116
 - plegada β , 26
- Holliday, modelo, 397
- Homeodominio, 437
- Homocigotas, 415
- Hormonas, células blanco, 184
- Horquilla de replicación, 358
- hsp, 350
- Huso mitótico, 375

- IF2, 346, 350
- Importinas, 296
- Impronta genómica, 324
- Inclusión(es), 59
 - citoplasmáticas, 103
 - cristalinas, 105
 - lipídicas, 105
- Índice nucleocitoplasmático, 13
- Inducción(es)
 - embrionarias, 432, 433
 - por hormonas, 434
 - enzimática, 335
- Inductor, 335
- Ingeniería genética, 71-80
- Inhibición por contacto, 174
- Inhibidores enzimáticos, 40
- Inmunoglobulinas, 175, 439
- Inmunohistoquímica, 66
 - marcaciones indirectas de un paso, 67
 - sistemas
 - de amplificación de la señal catalizada, 68
 - de tipo avidina-biotina (ABC), 67
 - tecnología de polímeros, 67
- Inmunología molecular, 438
- Inositol trifosfato, 409
- Inositol tetrafosfato, 409
- Integrinas, 134, 175
- Interacción(es)
 - hidrofóbicas, 37
 - intercelulares, 169
 - entre neurotransmisor y receptor, 208
 - con las matrices extracelulares, 169
 - de van der Waals, 37
- Interfase
 - en la meiosis, 403
 - períodos, 355, 373
- Internodos, 214
- Intrones, 308, 317, 327
 - remoción, 328
- Inversión cromosómica, 420
- Irritabilidad, 191
- IRF, 351

- Jun, 387

- Kartagener, síndrome, 124
- Klinefelter, síndrome, 422
- Krebs, ciclo, 278, 282

- Lactato, 286
- Lamelipodios, 132
- Lámina(s),
 - basales, 172
 - densa, 172
 - fibrosa, 151
 - lúcida, 172
 - nuclear, 293, 295, 381
 - rara, 172
- Laminina, 172
- Lanzaderas, para el transporte a la mitocondria, 285
- Leptonema, 393
- Leucemia mieloide crónica, 387, 424
- Leucoplastos, 449
- Ley(es)
 - de Mendel, 415
 - de la distribución independiente, 417
 - de la segregación, 415
- Ligamiento, 417
- Ligasa, ADN, 361
- Lignina, 445
- Línea
 - M, 137
 - Z, 137, 139
- Linfocitos
 - B, 438
 - T, 438
- Linfoma de Burkitt, 424
- Lípidos, 30-33
 - detección, 62
 - síntesis, en el retículo endoplasmático liso, 235
- Lipocromos, 106
- Lipofuscina, 106
- Liposomas, 90
- Lisosoma(s), 19, 256-263
 - contenido en enzimas, 257
 - funciones, 261
 - primario, 258
 - secundarios, 258
- Locus, 415
- Lupus eritematoso, 329

- Macropinocitosis, 265
- Macropinosomas, 264
- Macula adherens*, 162
- Maduración del espermatozoide, 407
- MAPs, en los microtúbulos, 108
- Marcación(es)
 - directa, 67
 - indirectas de un paso, 67
- Material pericentriolar, 116
- Matrices extracelulares, 169
- Matriz
 - ciliar, 119
 - citoplasmática, 103-154
 - mitocondrial, 281
 - nuclear, 14, 295
- Mecanismo(s)
 - de deslizamiento, en la contracción muscular, 144
 - del péptido señal, 228
- Medialuna gris, 431

- Megasporos, 459
 Meiosis, 16, 390-406
 en las células vegetales, 458
 diferencias con la mitosis, 390
 Melanina, 106
 Membrana(s)
 celular, 81-101
 diferenciaciones, 156-169
 hidratos de carbono, 88
 fluidez, 91
 lípidos, 84
 modelos artificiales, 90
 organización molecular, 82
 permeabilidad, 98
 proteínas, 85
 esqueleto, 131
 externa de las mitocondrias, 280
 interna de las mitocondrias, 280
 ondulantes, 118
 permeabilidad, 96
 plasmática, 12, 81-101
 en las células musculares, 136
 presináptica, 194
 postsináptica, 196
 tilacoide, 450
 Memoria celular, 435
 Mendel, leyes, 414
 Meromiosina, 141, 145
 Metacromasia, 63
 Metafase, 376
 Metahembra, 422
 Metamerización, 433
 Metilación
 de adeninas, 329
 del ADN, 324
 Metilasa de mantenimiento, 324
 7-Metilguanosina, 325
 Metiltransferasa, 326
 Método de transferencia del ADN, 76
 Micoplasmas, estructura, 8
 Microcirugía, 57
 Microfibrillas, en las células vegetales, 446
 Microfilamentos, 17, 126-136
 funciones, 131
 Micromanipulación celular, 57
 Micropinocitosis, 265
 Micropinosomas, 264
 Micropúas, 132
 Microscopia
 de contraste, videointensificada, 48
 electrónica, 50-55
 óptica, 46-50
 preparación de tejidos, 57-62
 Microscopio(s)
 confocal, 48
 de contraste de fases, 46
 electrónico
 de alto voltaje, 53
 de barrido, 54
 de transmisión, 50
 de fluorescencia, 48
 de fondo oscuro, 50
 de interferencia, 47
 de Nomarski, 47
 de polarización, 50
 Microsomas, 223, 234
 lisos, 234
 rugosos, 234
 Microsporos, 459
 Micrótomos, 59
 Microtúbulos, 17, 106-115
 centros organizadores, 110
 composición, 108
 funciones, 114
 inestabilidad dinámica, 111
 en la mitosis, 379
 morfología, 108
 Microvellosidades, 156
 Mieloma, 441
 Minerales celulares, 22
 Minisatélites, 298
 Miofibrillas, 137
 Miofilamentos, 137
 finos, 138, 142
 gruesos, 137
 proteínas estructurales, 143
 Miosina, 130, 141, 383
 Mitocondrias, 20, 274-290
 en la célula muscular estriada, 137
 crestas, 280
 estructura, 279
 funciones, 281-286
 en la grasa parda, 286
 matriz, 281
 membrana
 externa, 280
 interna, 280
 en la remoción del Ca^{2+} , 286
 reproducción, 286-290
 en la síntesis de aminoácidos, 286
 en la síntesis de esteroides, 286
 Mitosis, 14, 374-383
 anastrales en las células vegetales, 458
 diferencias con la meiosis, 390
 Modelo
 de Hollyday, 397
 del mosaico fluido, 84
 tridimensional del cuerpo, 436
 Mongolismo, 421
 Moléculas
 de adhesión celular, 169, 175
 de reconocimiento, 175
 Monosacáridos, 28
 Morfogénesis celular, función de los microtúbulos, 114
 Morfógenos, 432
 Mórula, 429
 Mosaico(s), 423
 de cromosomas sexuales, 422
 fluido, modelo, 84
 Motilidad celular, función de los microtúbulos, 115
 Movimiento ciliar, 121
 Muerte celular, 441
 programada, 442
 Músculo, biología celular y molecular, 136-150
 Mutación del ADN, 366
 Myb, 387
 Myc, 387, 443
 NAD, 276
 NADH, 276
 NADH reductasa, 280
 NADP reductasa, 455, 456
 Nebulina, 143
 Nernst, potenciales, 210
 Neuroblastoma, 387
 Neuropéptidos, 202
 Neurotransmisores, 193, 202
 clasificación, 202
 transporte, 205
 Nexina, uniones, 121
 Nexo, 159, 165
 Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), en las reacciones de oxidación y reducción, 279
 Nissl, sustancia, 214
 Niveles de organización, 2
 en las proteínas, 33
 No disyunción, 406, 418
 Nodos de Ranvier, 214
 Nódulo(s)
 de Hensen, 432
 de recombinación, 399
 Noggin, 434
 Nomarski, microscopio de, 47
Northern blotting, 77
 Notocorda, 432
 Nucleasa reparadora, 361
 Núcleo
 complejo del poro, 295
 componentes, 293
 envoltura, 17, 295
 estructura, 14
 forma, 12
 interfásico, 293-306
 matriz, 295
 Nucléolo, 14, 293
 en la síntesis y el procesamiento del ARNr, 333, 345
 Nucleoplasma, 295
 Nucleoporinas, 296
 Nucleósidos, 24
 Nucleosomas, 298, 323, 357
 Nucleótidos, 24
 Okazaki, fragmentos, 360
 Oligosacáridos, 29
 Oncogenes, 386, 387
 Operador, 335
 Operón
 lac, 335
 triptófano, 337
 Organizador
 nucleolar, 333
 de Spemann, 434
 Organoides microtubulares, 116-126
 Origen de replicación, 297, 358
 Ovocitos, 403
 Ovogonias, 391
 Ovulación, 406
 Oxidasas, detección, 66
 Oxido nítrico, producción celular, 182
 Oxido nítrico sintasa, 182

- p53, 386, 387
 Papilomavirus, 387
 Paquinema, 397
 Pared celular, 12, 445-448, 459
 primaria, 446
 en los procariotas, 6
 secundaria, 446
 Partículas
 β , 105
 PRS, 309
 de reconocimiento de señal, 228
 Patau, síndrome, 421
 PCNA, 361
 PCR. V. Reacción en cadena de la polimerasa
 Pectina, 459
 Pedículos basales, 121
 Penetración
 de la corona radiante, 408
 de la membrana pelúcida, 410
 Peptidasa señal, 229
 Péptido(s)
 opioides, 203
 señal, 289, 296, 350
 mecanismo, 228
 Período refractario, en la transmisión nerviosa, 215
 Permeabilidad
 de las membranas celulares, 98
 pasiva, 97
 Permeasas, en el transporte pasivo, 99
 Peroxisomas, 20, 290, 447
 PH20, 410
 PH30, 411
 Pigmentos citoplasmáticos, 106
 Pinocitosis, 264
 tipos, 265
 Pirimidinas, 23
 Piruvato, 277, 286
 Piruvato deshidrogenasa, 277
 Placa(s)
 de adhesión, 134, 173
 de anclaje, 173
 celular, 446, 459
 ciliar, 121
 de fijación, 397
 Placoglobina, 163
 Plan corporal, 429, 436
 Plantas, reproducción, 458
 Plásmidos, 7, 73
 Plasmocitos, 439
 Plasmodesmos, 12, 447, 459
 Plasmodios, 13
 Plástidos, 20, 448
 Plastocianina, 456
 Plastoquinona, 456
 Polarización celular, función de los microtúbulos, 115
 Polen, 459
 Poli A, 317, 326
 Poli A polimerasa, 326
 Poliadenilación, 326, 329
 Polimerasa(s). V. ADN polimerasa y ARN polimerasa
 Polipéptidos, 33
 de la banda 6, 163
 Poliploidías, 418
 Poliproteínas, 308, 353
 Polirribosomas, 226, 346, 347
 Polisacáridos, 21, 29
 Polispermia, bloqueo, 411
 Porina, 6, 280
 Poro(s)
 complejo, en la envoltura nuclear, 295
 nucleares, 14, 295
 Potenciales
 de acción, propagación, 215
 generadores, 196
 de membrana, en reposo o equilibrio, 210
 miniatura de la placa, 205
 de Nernst, 210
 postsinápticos
 excitatorios, 197
 inhibitorios, 197
 sinápticos, 196
 excitatorios, 197
 de transferencia de los electrones, 283
 Potencialidad evolutiva, 435
 Prader-Willi, síndrome, 325
 Preleptonema, 393
 Preparación de tejidos, para estudio microscópico, 57-62
 Preproteínas, 229
 Preproteínas, 229
 Primasa, ARN, 360
 Proacrosina, 411
 Procariotas, 5, 6, 44
 Procentríolos, 116, 378
 Procesamiento del ARN, 317
 mensajero, 325-330
 Proenzimas, 41
 Profase, 375
 Prolactina, 351
 Prometáfase, 376
 Promotor, en los genes, 310, 316, 320, 335
 Pronúcleo(s), 412
 femenino, 412
 masculino, 412
 Proopiomelanocortina, 353
 Proplástidos, 451
 Proteínas, 229, 249
 Prosómeras, 433
 Proteína quinasas, dependientes de calcio/calmodulina, 190
 Proteína(s), 21, 33-38
 asimetría, 87
 autoensamblaje, 42
 de banda 3, 94
 de banda 4.1, 94
 BiP, 230
 C, 143
 chaperonas, 288
 conjugadas, 33
 detección, 65
 dirección y segregación, 231
 estructura, 33-38
 primaria, 33
 secundaria, 33
 terciaria, 36
 cuaternaria, 36
 estructurales, de los miofilamentos, 143
 extrínsecas, 87
 fibrosas, 33
 fijadoras de actina, 130
 G, 186, 270
 globulares, 33
 integrales, 85
 intercambiadoras, 289
 en los peroxisomas, 291
 85 K, 143
 de la línea M, 143
 de la membrana celular, 85
 síntesis y ensamble, 232
 microtubulares asociadas, 108, 113
 mitocondriales, síntesis, 288
 motoras, 113
 niveles de organización, 33
 p16, 386
 p21, 386
 p53, 386, 387, 443
 periféricas, 87
 Rb, 386, 388
 receptoras, 210
 regulación de la degradación, 350
 ribosómicas, 332
 secreción por las células, 248-256
 síntesis, etapas, 346-350
 τ (tau), 113
 translocación
 cotraduccional, 232
 postraduccional, 232
 transmembranosas, 86
 transportadoras, 97
 en la membrana mitocondrial, 280
 Proteinoides, 43
 Proteoglicanos, 30, 170
 Proteoglucanos, 30, 170
 Protooncogenes, 386
 PRS, partículas, 309
 Puentes de hidrógeno, 25, 37
 Punto(s)
 adherente, 164
 de arranque, en el ciclo celular, 383
 de control G1, en el ciclo celular, 383
 de fisión, en las cadenas de ADN, 27
 isoeléctrico, de las proteínas, 38
 de ramificación, 328
 Purinas, 23
 Puromicina, 350
 Quiasmas, 399
 Quinasas, dependientes de ciclinas, en el control de las divisiones celulares, 383
 Quinesinas, 114
 Quitina, 446
 Quitina sintetasa, 447
 Quitisomas, 447

- Radioautografía, 68
 Raf, 387
 Raíces ciliares, 118, 121
 Ranvier, nodos, 214
 Ras, proteína, 387
 Rastreo de partículas aisladas, 93
 Reacción(es)
 acrosómica, 409
 en cadena de la polimerasa (PCR), 77
 cortical, 411
 de Feulgen, 63
 del PAS, 63
 Reactivo de Schiff, 62
 Receptor(es)
 de la acetilcolina, 208
 en la membrana postsináptica, 211
 canales, regulados por neurotransmisores, 185
 citosólicos, 182
 colinérgico, 196
 enzimas, 185
 específicos, 182
 externos, 182
 fosfatasas, 186
 guanilciclasas, 186
 hormonales, 434
 intracelulares, 184
 de membrana, 184
 de la partícula de reconocimiento de señal, 228
 relacionados con proteínas G, 186
 del ribosoma, 228
 quinasas
 de serina-treonina, 186
 de tirosina, 186
 de tiroxina, 185
 Receptosomas, 271
 Recombinación genética, 397, 404, 417
 módulos de, 399
 Red terminal, 157
 Regla de Dale, 204
 Reguladores, 310, 320
 amplificadores, 310
 inhibidores, 310
 Renaturalización del ADN, 27
 Reparación del ADN, 368
 Replicación del ADN, 308, 355-366, 368
 orígenes, 358
 papel del cebador, 360
 en los télómeros, 362
 unidades, 357
 burbuja, 358
 horquilla, 358
 Replicón, 359
 Represión enzimática, 337
 Reproducción de las plantas, 458
 Respuesta(s)
 celulares
 mediadas por AMPc, 187
 mediadas por calcio, 190
 graduada, en el tejido nervioso, 218
 de todo o nada, 215
 Retículo
 cis-Golgi, 241
 endoplasmático, 17, 223-239
 liso, 233
 rugoso, 223
 sarcoplasmático, 238
 en la célula muscular estriada, 137
 terminal, 164
 trans-Golgi, 242
 Retinoblastoma, 386, 424
 Retrovirus, 370
 Ribete en cepillo, 157
 Riboforinas, en los ribosomas, 226
 Ribonucleasa, 36
 Ribonucleoproteína(s), 223
 heterogénea nuclear, 318
 nucleares pequeñas, 308, 327
 Ribosa, 23
 Ribosomas, 311, 344
 asociados al RE, 346
 en los cloroplastos, 452
 libres, 227, 346
 mitocondriales, 287
 en los procariotas, 7
 Ribulosa 1,5-difosfato, 457
 Ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa, 453, 457
 Rigidez cadavérica, 146
 RNPhn, 318, 342
 RNPs, 308, 327
 Rombómeras, 433
 SII, 318
 SIII, 318
 SAR, 300, 357
 Sarcoma
 de Kaposi, 387
 de Rous, 387
 Sarcómero, 136
 Satélites
 centriolares, 116
 en los cromosomas, 303
 de los cuerpos basales, 121
 Schiff, reactivo, 62
 Secreción
 endocrina, 434
 paracrina, 434
 de proteínas, 248
 constitutiva, 249
 etapas, 251
 facultativa, 249
 Secuencia(s)
 alfoide, 298, 379
 codificadoras, 310
 espaciadoras, 331
 promotoras, 310
 reguladoras del gen, 310
 de replicación autónoma, 297
 de terminación, 310
 Secuenciación del ADN, 71
 Segmentación celular, 429
 Segmento codificador, 312
 Segundos mensajeros, 187
 Selección clonal, 439
 Selectinas, 175
 Señal(es)
 intercelulares, transducción, 182
 de terminación, 326
 Señalización intercelular, 181-220
 autocrina, 181
 endocrina, 181
 paracrina, 181
 sináptica, 181
 Seudogenes, 370
 Shh, proteína, 434
 Significado evolutivo, 434
 Simporte, 97
 Sinapsina I, en los terminales axónicos, 212
 Sinapsis
 axoaxónicas, 193
 axodendríticas, 193
 axosomáticas, 193
 dendrodendríticas, 194
 estructura, 192
 glomerulares, 194
 invaginadas, 194
 receptores, 207-214
 colinérgico, 196
 recíproca, 193
 seriada, 193
 somatodendríticas, 193
 transmisión
 eléctrica, 192
 química, 192
 zonas activas, 194
 Síndrome
 de Angelman, 325
 de Chédiak-Higashi, 113
 del cilio inmóvil, 124
 de Down, 40, 421, 423
 de Edwards, 421
 de Kartagener, 124
 de Klinefelter, 422
 del maullido de gato, 424
 de Patau, 421
 de Prader-Willi, 325
 de Turner, 423
 XXX, 422
 YYY, 422
 de Zellweger, 291
 Singamia, 412
 Síntesis proteica, etapas, 346-350
 Sistema(s)
 contráctil, organización molecular, 141-146
 de la dinorfina, 203
 de la encefalina, 203
 de endomembranas, 17, 222-273
 de la β -endorfina, 203
 oxidativo de función mixta, 236
 de la proopiomelanocortina, 204
 de tipo avidina-biotina (ABC), 67
 vacuolar citoplasmático, 259
 Sitio AP, 368
 SL1, 330
 Slug, proteína, 434
 Solenoide, 300
 Somatomedina, 383
 Somitas, 433

- Sondas de ADN, 76
Southern blotting, 77
 Spemann, organizador, 434
 Src, 387
 SSB, proteínas, 362
 Subunidad ribosómica mayor, 349
 Sulfotransferasas, 236
 Superficie celular, 155-180
 en las células cancerosas, 175
 Superóxido dismutasa, 291
 Sustancia(s)
 inductoras de la proliferación celular, 385
 de Nissl, 214
 pépticas, 445
 Svedberg, unidades, 71
- TAF, 318
 TATA, caja, 310, 318
 TBP, 318
 Técnica(s)
 del ADN recombinante, 73
 de bandeado cromosómico, 303
 de congelación y fractura, 53
 de hibridación *in situ*, 79
 Tecnología de polímeros, en inmunohistoquímica, 67
 Telofase, 377
 reconstrucción de la envoltura nuclear, 381
 Telomerasa, en la replicación del ADN, 362
 Telómeros, 297, 303, 362
 Teoría celular, 3
 Tetraciclina, 350
 Tétrada, 399
 Tilacoides, 449
 Timina, 23
 Timosina, 130
 Titina, 143
 Topoisomerasa
 I, 317, 363
 II, 363. V. Girasa
 Traducción
 del ARN, 23, 308
 mensajero, 342-354
 del mensaje génico, 227
 Trama microtrabecular, 127
 Trampas de láser, 93
 Transcripción, 307
 del ADN, 307, 315-340, 356, 365
 bases moleculares, 319
 factores, 184, 317
 Transcriptasa inversa, 370
 Transcripto primario, 308, 317
 marcas particulares, 328
 procesamiento, 329, 439
 Transducción de las señales intercelulares, 182
 Transferencia del ADN, 77. V. *Southern blotting*
 Transferrina, 351
 Transiciones reversibles sol-gel, 131
- Tránsito intracelular, 270
 Translocación
 cotraduccional, 232
 cromosómica, 420
 robertsoniana, 420
 postraduccional, 232
 en la síntesis proteica, 347
 Transmisión sináptica, 192-220
 eléctrica, 192
 hipótesis vesicular, 205
 papel de la calmodulina, 207
 química, 192
 Transportadores, 99
 Transporte
 activo
 indirecto, 97, 101
 primario, 97, 100
 secundario, 97, 101
 axónico, 214-220
 intracelular, función de los microtúbulos, 115
 pasivo, 98
 Transposición de secuencias del ADN, 369
 Transposones, 369
 Trasplante nuclear, 427
 Tríada, 194
 Triglicéridos
 biosíntesis, 235
 celulares, 30
 Tripletes, 342
 microtubulares, 116
 Trofoblasto, 430
 Tropomiosina, 130, 142
 Troponinas, 142
 Tubo(s)
 neural, 433
 T, 147
 Tubulina, 109, 351
 en los microtúbulos, 17, 108
 Turner, síndrome, 423
- Ubiquinona, 280
 Ubiquitina, 353
 Ultracentrifugación analítica, 71
 Ultramicrótomos, 53
 Unidad(es)
 de membrana, 83
 de replicación, 357
 Svedberg, 71
 Unión(es)
 de alta energía, 254
 comunicantes, 159, 165
 covalentes, 37
 electrostáticas, 37
 con espacio, 159, 165
 estrechas, 189
 en el desarrollo embrionario, 430
 fosfodiéster, 315
 de hendidura, 159, 165
 en el desarrollo embrionario, 430
 intercelulares, 157
 intermedia, 158, 163
 iónicas, 37
 de nexina, 121
 no covalentes, 37
 oclusiva, 159
 peptídica, 33, 342
 septadas, 165
 Uracilo, 23
- Vacuola(s)
 autofágica, 259
 citoplasmáticas, en las células vegetales, 447
 digestiva, 259
 parasitofóricas, 264
 Variabilidad genética, 391
 VBF, 330
 Vesículas
 apoptóticas, 442
 con cubierta, 267
 de pinocitosis, 264
 sinápticas, 199-207
 con cubierta, 200
 claras esféricas, 200
 elípticas o aplanadas claras, 200
 granulares
 grandes, 200
 pequeñas, 200
- Vía
 de la adenilato ciclasa, 187
 de la fosfolipasa C- β , 189
 Vibrátomo, 59
 Villina, 130
 Vimentina, en los filamentos intermedios, 152
 Viroides, 9
 Virus
 estructura, 8
 Sendai, 427
- Western blotting*, 77
 Wnt, 434
- Xilema, 445
 XXX, síndrome, 422
 YYY, síndrome, 422
- Z-ADN, 27
 Zellweger, síndrome, 291
 Zimógeno, 41
 gránulos, 249
Zonula adherens, 158, 163
Zonula occludens, 159
 ZP1, 407
 ZP2, 407, 410, 411
 ZP3, 407, 409, 410, 411

De nuestro fondo editorial

Atlas de histología

M. S. H. Di Fiore

Fundamentos de biología celular y molecular

E. D. P. De Robertis y E. M. F. De Robertis

Química biológica

A. Blanco

Fisiología humana de B. Houssay

H. E. Cingolani, A. B. Houssay y col.

Tomo 1: *Fisiología general. Sangre e inmunidad. Digestivo.*

Tomo 2: *Circulatorio. Respiratorio. Riñón y electrolitos.*

Tomo 3: *Metabolismo y endocrinología. Reproducción.*

Tomo 4: *Neurofisiología.*

Patología general

S. C. Besuschio

Patología especial

S. C. Besuschio y col.

Virología médica

G. Carballal y J. R. Oubiña

Diccionario de Ciencias Médicas

Diccionario de Medicina

Abreviado

DE ROBERTIS (h.) · HIB · PONZIO

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

de Eduardo D. P. De Robertis



185



ISBN 950-02-0364-2



9 789500 203647